Série A, n° 3857
N° d'Ordre :
4708

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Thérèse HEYMAN née BLANCHET

1ère THESE. — "Étude de l'équipement cytochromique de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose ou en anaérobiose".

2ème THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 MAI 1962 devant la Commission d'examen.

M. LEDERER *Président.*

Mme CHAIX
M. CAMUS
} *Examinateurs.*

M. SLONIMSKI *Invité.*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538119_0011

Série A, n° 3857
N° d'Ordre :
4708

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Thérèse HEYMAN née BLANCHET

BIBLIOTHÈQUE

1ère **THESE.** – "Étude de l'équipement cytochromique de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose ou en anaérobiose".

2ème **THESE.** – Propositions données par la Faculté.

Soutenues le **devant la Commission d'examen.**

M. LEDERER *Président.*

Mme CHAIX
M. CAMUS } *Examinateurs.*

M. SLONIMSKI *Invité.*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Janvier 1962)

- PROFESSEURS -

Doyen : **M. ZAMANSKY**

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T	Chimie organique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (ORSAY).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRETIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIERE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biolcgie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HERITIER	T	Biologie Générale (ORSAY).
GRIVET	T	Radioélectricité (ORSAY).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (ORSAY).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (ORSAY).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des solides (ORSAY).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral.
NORMANT	T	Synthèse organique générale.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARECHAL	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
PISOT	T	Technique mathématique de la physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (ORSAY).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.

AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (ORSAY).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.).
BRUN	T	Mécan. théorique des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.).
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL André	T	Chimie minérale (ORSAY).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (ORSAY).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER		Physiologie comparée.
CAMUS		Physiologie végétale (B.M.P.V.).
CASTAING	T	Physique (ORSAY).
CURIEN	T	Minéralogie et cristallogr.
MOYSE	T	Physiologie végétale (ORSAY).
NOIROT		Evolution des êtres organisés.
PANNETIER	T	Chimie générale (ORSAY).
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMAN	T	Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART		Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (ORSAY).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biologie végétale S.P.C.N. (ORSAY).
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
Mlle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY).
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY).
DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY).
DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (ORSAY).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
FRIEDEL		Physique des solides (ORSAY).
M. JULIA		Etudes des molécules naturelles complexes.
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N.) ORSAY.
MAGAT		Physico-chimie des radio-léments.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie.
LEMEE	T	Physiologie vég. B.M.P.V. (ORSAY).
GUERIN	T	Chimie M.P.C. (ORSAY).
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physique nucléaire (ORSAY).
MATTLER	T	Physique S.P.C.N. (ORSAY).
MICHEL Louis		Physique théor. des hautes énergies (ORSAY).
BERGERARD		Zoologie (ORSAY).
BERTEIN		Electronique (ORSAY).
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (ORSAY).
Mme COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique.
ELLENBERGER		Géologie appliquée sur le terrain.
FRANC		Biol. animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY).
STOLKOWSKI		Physiologie générale.
ACHER		Chimie biol. (ORSAY).
BAUDOIN		Biologie animale P.C.B.
BEAUMONT		Biologie animale S.P.C.N.
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOURREAU		Botanique.
CURIE D.		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FREON	T	Chimie organique (ORSAY).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.).
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et méc. céleste.
Mlle VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNSCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires.
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (ORSAY).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (ORSAY).
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY).
CAIRE		Géographie phys. et Géol. Dynamique.
COMOLET		Mécanique des fluides.
CORABŒUF		Physiologie animale.
DELLOUE		Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale P.C.B.
JULLIEN J.		Chimie P.C.B.
MALGRANGE		Tech. math. de la phys.
OLIVIER		Antropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE		Physique ENS. (Orsay).

Secrétaire général : R. POULLAIN

INTRODUCTION

Bien que la levure de boulangerie ait un métabolisme fermentaire très développé, il n'avait pas été possible jusqu'à ces dernières années de la cultiver d'une façon satisfaisante en anaérobiose. La légère croissance observée par différents auteurs était d'ordinaire attribuée à la présence de traces d'oxygène dans le milieu (1-5). Au cours d'études commencées en 1950 sur la croissance anaérobie de la levure, Stier et ses collaborateurs (6, 7) ont montré que la levure de boulangerie peut être cultivée en anaérobiose stricte avec un bon rendement, à condition d'ajouter à un milieu complexe à base d'extrait de levure, de l'ergostérol et des acides gras non saturés à longue chaîne. Dans ces conditions, le rendement des cultures anaérobies est proche de celui des cultures aérobies.

La levure de boulangerie constitue par conséquent un matériel propice à l'étude de l'équipement en enzymes hématiniques que présente une même souche cellulaire se développant en présence ou en absence d'oxygène.

Dans une étude classique sur les pigments hématiniques de différentes cellules aérobies, Keilin en 1925 (8) a décrit le spectre cytochromique de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose: lorsque les pigments sont à l'état réduit *, le spectre observé à la température ordinaire présente dans le visible les bandes d'absorption suivantes: aα (604 mμ), bα (564 mμ), cα (550 mμ) et une bande située vers 525 mμ

* Rappelons que les cytochromes sont des hémoprotéines dont le spectre réduit (atomes de fer de l'hème à l'état divalent) présente en général dans la région visible du spectre deux bandes d'absorption α et β. A l'état oxydé (atome de fer de l'hème à l'état trivalent), le spectre présente seulement dans cette région une bande faible, diffuse. De plus, à l'état oxydé comme à l'état réduit, le spectre cytochromique est également caractérisé par une bande intense, bande γ ou bande de Soret, située entre 400 et 450 mμ.

correspondant aux bandes β fusionnées des cytochromes b et c. En 1938, Keilin et Hartree (9, 10) présentèrent des résultats d'après lesquels la bande aα située à 604 mμ serait la résultante des bandes α de deux pigments: l'un d'eux garda le nom de cytochrome a et l'autre, capable de se combiner avec l'oxyde de carbone et le cyanure, fut appelé cytochrome a_3 et identifié à l'oxydase découverte par Warburg en 1929 (11) par voie photochimique, le ferment respiratoire. De plus, en 1948, Keilin et Hartree (12) décelèrent par spectroscopie à la température de l'air liquide (-170°), une bande d'absorption située à 552 mμ qu'ils attribuèrent à un nouveau pigment hématinique, le cytochrome c_1 (13): un fort abaissement de la température améliore en effet considérablement la résolution des spectres d'absorption.

Seul, le cytochrome a a été obtenu à l'état cristallisé (14). Aucune tentative de purification à partir de la levure des cytochromes c_1, b, a et a_3 ne semble avoir été faite.

Le spectre cytochromique décrit par Keilin dans la levure de boulangerie - dit spectre classique - ressemble à celui qui a été observé dans de nombreux tissus animaux et végétaux, en particulier, dans des particules subcellulaires telles que mitochondries de cellules hépatiques (15), sarcosomes de cellules de muscle cardiaque (16), mitochondries de cellules végétales (17). Un certain nombre de travaux (18, 19) ont établi que la chaîne respiratoire, à l'action de laquelle participent les cytochromes dans le transfert des électrons des métabolites à l'oxygène, est localisée dans la membrane mitochondriale et dans les ramifications internes de cette membrane ou "crêtes". L'existence de mitochondries chez la levure cultivée en aérobiose a été mise en évidence par différents auteurs (20, 21, 22, 23). Un spectre d'absorption d'une préparation de mitochondries de levures a été présenté par Chance (24); ce spectre comporte les mêmes bandes d'absorption α que la cellule entière à l'exception de la bande α du cytochrome c, pigment dont la solubilité permet de supposer qu'il a été perdu par les mitochondries au cours de leur isolement.

La levure cultivée en aérobiose contient non seulement les cytochromes de la chaîne respiratoire classique, mais aussi d'autres pigments hématiniques qu'il n'est pas possible d'identifier par simple examen spectroscopique de la cellule entière. Il s'agit d'une part du cytochrome b_2 (α = 557 mμ à la température ordinaire),

d'autre part des hydroperoxydases (catalase et peroxydase). Le cytochrome b_2 extrait par Bach et coll. (25), puis isolé à l'état cristallisé par Appleby et Morton d'une part (26) et par Rippa (27) d'autre part, fut identifié comme étant une flavohémoprotéine (25-29) responsable de l'oxydation du L-lactate. Le spectre à basse température de ce cytochrome présente deux bandes d'absorption α situées à 552 mμ et à 558 mμ (30), à peu près aux mêmes longueurs d'onde que les bandes $c_1\alpha$ et bα. Une catalase (31) et une peroxydase (32) de levure ont aussi été extraites et purifiées. La peroxydase oxyde spécifiquement le ferrocytochrome c en présence d'H_2O_2. Le fer de ces hémoprotéines, contrairement à celui des cytochromes, ne change pas de valence et reste continuellement à l'état ferrique. Ces enzymes existent dans la levure en trop faible concentration pour pouvoir y être décelée par spectroscopie in situ.

Pour la première fois en 1950, Ephrussi et Slonimski (33) ont montré que la levure cultivée en anaérobiose stricte possède également des pigments hématiniques: ils ont appelé cytochrome b_1 * et cytochrome a_1 les composés correspondant à la température ordinaire à des bandes d'absorption situées à 557 mμ d'une part et à 580 mμ d'autre part. Ultérieurement, Lindenmayer et Smith (30) ont constaté que la levure cultivée en anaérobiose pouvait présenter des bandes d'absorption α situées à 555 mμ et à 585 mμ.

Les cytochromes des levures cultivées en anaérobiose ne participent évidemment pas à une chaîne respiratoire. Ephrussi et Slonimski (33) ont également montré que l'aération des levures cultivées en anaérobiose et mises en suspension à l'état de cellules non proliférantes dans du tampon glucosé, provoque l'apparition du système cytochromique classique. Ces auteurs ont envisagé la possibilité que les pigments hématiniques de la levure cultivée en anaérobiose soient les précurseurs des cytochromes aérobies (33, 35). Toutefois, d'autres hypothèses concernant leur fonction peuvent maintenant être avancées. En effet, ultérieurement aux expériences de ces auteurs, différents cytochromes intervenant dans des chaînes d'oxydo-réduction dont l'oxygène moléculaire n'est pas l'accepteur final ont été mis en évidence: c'est le cas du cytochrome b_5, localisé dans les microsomes des cellules hépatiques, particules

* La discussion de cette terminologie est donnée page 56 .

non respiratoires (36); c'est le cas des cytochromes présents dans des microorganismes anaérobies, le cytochrome c_3, enzyme participant à la réduction des sulfates chez Desulfovibrio desulfuricans (37), les cytochromes des bactéries autotrophes par photosynthèse telles que Rhodospirillum rubrum (38), Chromatium et Chlorobium limicola (39); c'est également le cas du cytochrome f, associé aux tissus chlorophylliens (40). Il est donc possible que les pigments hématiniques de la levure cultivée en anaérobiose ne représentent pas seulement une réserve de protohème, par exemple pour la synthèse des cytochromes aérobies, mais qu'ils aient une fonction propre dans le métabolisme de la levure anaérobie.

Si l'on possède déjà beaucoup de données sur le rôle des cytochromes de la levure cultivée en aérobiose, il n'en est pas de même des cytochromes de la levure cultivée en anaérobiose: les spectres cytochromiques décrits par différents auteurs ne concordent pas exactement, on ne connaît ni les substrats avec lesquels ces pigments réagissent, ni leur localisation intracellulaire; ce dernier problème pose aussi la question de savoir si la levure cultivée en anaérobiose, bien que dépourvue des enzymes de la chaîne respiratoire classique, possède ou non des mitochondries.

Dans le présent travail, nous nous sommes tout d'abord attachés à préciser par spectrographie à basse température l'équipement cytochromique de la levure récoltée à différentes phases de sa croissance, aérobie ou anaérobie. Il a été en effet démontré dans le cas de plusieurs microorganismes que leur équipement cytochromique varie suivant les phases de leur croissance (41) ou suivant la vitesse de leur multiplication cellulaire (42).

De plus, en vue de rechercher les relations éventuelles existant entre les pigments des levures cultivées en aérobiose et ceux des levures cultivées en anaérobiose, nous avons étudié en fonction du temps les changements spectraux provoqués par l'aération des levures récoltées à différentes phases de leur croissance anaérobie.

Connaissant ainsi l'équipement cytochromique des levures cultivées dans différentes conditions et récoltées à différents stades de leur croissance, il nous a paru intéressant de déterminer la répartition intracellulaire de ces pigments parallèlement à la répartition de l'activité lacticodéshydrogénase. Dans ce but, nous

avons mis au point, en collaboration avec F. Zajdela [*], une technique de fractionnement permettant d'isoler des particules morphologiquement peu altérées (comme le montre le contrôle par microscopie électronique). De plus, en vue de déterminer sur quelle chaîne de transfert d'électrons fonctionnent les pigments observés, nous avons recherché les agents réducteurs avec lesquels ils sont capables de réagir dans les fractions subcellulaires.

Dans une première partie, nous décrirons les conditions de nos expériences et les techniques ayant nécessité une mise au point particulière utilisées au cours de ce travail.

Dans une deuxième partie, nous décrirons:

a) les différents types d'équipement cytochromique de la levure cultivée en aérobiose et en anaérobiose,

b) les étapes spectrales de la transformation du système cytochromique anaérobie en système cytochromique aérobie en présence d'oxygène moléculaire.

Dans une troisième partie, nous décrirons d'abord l'aspect morphologique des différentes fractions subcellulaires obtenues; ensuite, nous analyserons d'une part, le spectre de ces fractions traitées par différents agents réducteurs, d'autre part, la répartition dans ces fractions de l'activité lacticodéshydrogénase; enfin, nous expeserons les résultats des expériences concernant l'aptitude respiratoire des particules mitochondriales isolées à partir de la levure cultivée en aérobiose et des particules de la fraction homologue isolées à partir de la levure cultivée en anaérobiose.

Les résultats obtenus seront discutés à la fin de chaque chapitre.

---

[*] F. Zajdela, Institut du Radium, Paris.

- Liste des abréviations
utilisées dans le texte -

U.C.	Unité Coleman définie page 9
e	Epaisseur des préparations spectrographiées
SHP	Suc digestif d' Helix pomatia
PVP	Polyvinylpyrrolidone: polymère du I-vinyl-2-pyrrolidone
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
DPN	Diphosphopyridine nucléotide
DPNH	Diphosphopyridine nucléotide réduit
TPN	Triphosphopyridine nucléotide
TPNH	Triphosphopyridine nucléotide réduit
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
TPP	Thiamine pyrophosphate

P R E M I E R E P A R T I E

MISE AU POINT

DES TECHNIQUES UTILISEES

C H A P I T R E I

TECHNIQUES DE CULTURE

Estimation de la croissance des levures

I - SOUCHES.

La souche diploïde "Yeast Foam" utilisée au cours de ce travail appartient à l'espèce Saccharomyces cerevisiae, levure de boulangerie. Quelques études spectrographiques ont également été faites (2ème Partie, Chapitre II) avec un mutant "petite colonie" souche "Yeast Foam A" obtenu par traitement par acriflavine de la souche "Yeast Foam". Ces souches nous ont été aimablement communiquées par P. Slonimski. Elles sont conservées par repiquage dans des tubes contenant 5 ml d'un milieu de culture solide incliné. La composition de ce milieu est le même que celle du milieu liquide utilisé pour les cultures en aérobiose (voir p.10), additionné d'agar-agar en poudre "Prolabo", à raison de 30 g par litre. Dans tous les cas, les levures utilisées pour les expériences sont cultivées sur milieu liquide.

II - ESTIMATION DE LA CROISSANCE DES CULTURES.

La croissance est estimée par des mesures néphélométriques faites à l'aide du spectrophotomètre Coleman Jr. Une prise d'essai de la culture est placée dans un tube de 19 mm de diamètre. Le zéro de l'appareil est établi avec un tube identique contenant le milieu de culture non ensemencé. Les lectures sont faites avec une lumière monochromatique (λ = 500 mμ).

A - Rapport entre poids sec et densité optique.

Entre zéro et 0,45 unités photométriques, la densité optique des suspensions de levure est proportionnelle au poids sec (figure 1). Il est nécessaire de diluer les suspensions avec du milieu non ensemencé quand leur densité optique est supérieure à 0,45 unités. Dans nos conditions, une variation de densité optique de 0,01 unités correspond à 17,1 µg de levure, poids sec/ml; c'est ce que nous appelons une "Unité Coleman" (U.C.).

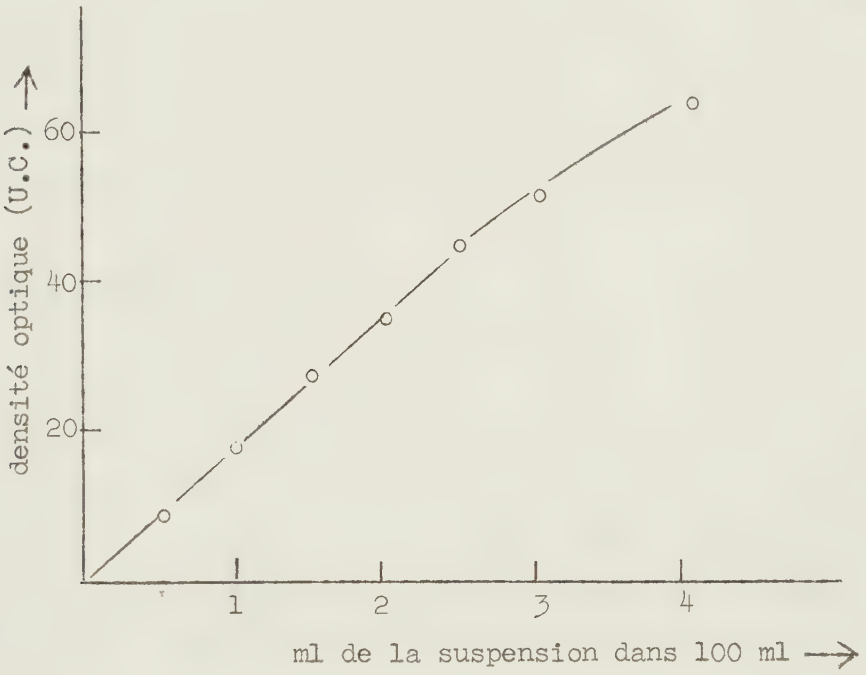


Figure 1: Relation entre densité optique et poids sec d'une suspension de levure.
- en ordonnées: densité optique en Unités Coleman.
- en abscisses: ml d'une suspension contenant 31,7 mg de cellules de levures poids sec/ml dilués à 100 ml.

B - Rapport entre densité optique et nombre de cellules.

Afin de pouvoir comparer d'une façon approximative certains de nos résultats avec ceux d'autres auteurs se référant non au poids sec, mais au nombre de cellules par ml, nous avons recherché avec une culture récoltée en phase exponentielle de croissance aérobie quel était le nombre de cellules de levure correspondant à une Unité Coleman. Les comptages cellulaires ont été effectués avec un hématimètre de Malassez. Une Unité Coleman correspond à $1,2.10^6$ cellules/ml.

C - Etablissement de la courbe de croissance.

La courbe de croissance est établie en portant en ordonnées le $\log_2$ de la densité optique et en abscisses la durée d'incubation. Un accroissement d'une unité en ordonnées correspond à un doublement de la densité optique de la culture. La phase exponentielle pendant laquelle les cellules se multiplient à une vitesse constante s'exprime alors par une droite. Le taux de croissance μ, égal au nombre de divisions cellulaires par unité de temps, correspond à la pente en coordonnées semi-logarithmiques de cette droite (43). Le temps de latence de la croissance "comprend la période qui s'étend entre l'inoculation et le moment où s'établit le taux de croissance constant (et maximum) caractéristique de la phase exponentielle" (43). Quel que soit le milieu utilisé, la croissance ne s'arrête pas brutalement à la fin de la phase exponentielle, mais elle se ralentit progressivement (phase de ralentissement) avant de s'arrêter (phase stationnaire).

III - CULTURE EN AEROBIOSE.

A - Conditions de culture.

L'incubation est faite à 25°. Les cultures sont ensemencées à partir de précultures en phase exponentielle de croissance. Celles-ci sont réalisées dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 10 ml de milieu et agités sur un plateau animé d'un mouvement de va-et-vient à raison de 130 oscillations par minute avec une amplitude de 4 cm. Les précultures sont elles-mêmes ensemencées à partir de la souche conservée sur milieu solide.

Les cultures sont réalisées soit dans des récipients ayant la forme de "fioles à toxine" de 2.000 ml contenant 200 ml de milieu et agitées de la même façon que les précultures, soit dans des ballons de 6 litres contenant 2 litres de milieu dont l'homogénéité est maintenue grâce à la rotation d'un barreau aimanté. Dans ce dernier cas, une aération convenable est obtenue par passage d'air comprimé; celui-ci est débarrassé de ses impuretés par barbotage dans trois flacons laveurs contenant HCl N, NaOH N et de l'eau distillée, puis par passage à travers un filtre de coton.

B - Milieu de culture.

Le milieu de culture liquide utilisé a la même composition que celui donné par Ephrussi et coll. (44): Yeast Extract Difco 10 g, KH_2PO_4 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1,2 g, glucose anhydre 54 g, eau distillée qsp 1.000 ml, pH 5,6.

C - Courbe de croissance.

La courbe de croissance des cultures aérobies est donnée dans la figure 2. Le taux de croissance est égal à 0,75. Dans le cas des cultures sur ce milieu complexe, on n'observe pas de temps de latence quand l'inoculum est prélevé pendant la phase exponentielle de croissance de la préculture.

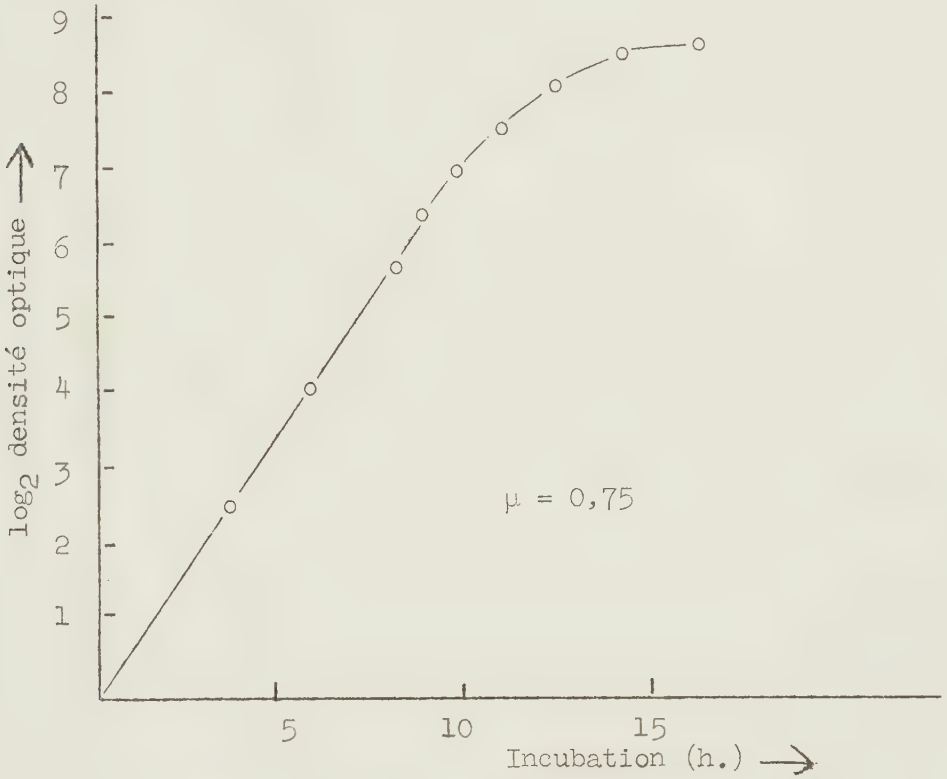


Figure 2: Courbe de croissance de la levure cultivée en aérobiose sur milieu à l'extrait de levure.

IV - CULTURE EN ANAEROBIOSE.

Stier et ses collaborateurs (6, 7) ont montré qu'il est possible d'obtenir un grand nombre de générations cellulaires en anaérobiose stricte en ajoutant au milieu de culture de l'ergostérol et du Tween 80 * (ou des acides gras non saturés à longue chaîne). Ces auteurs ont même mis au point un appareil permettant de réaliser des cultures continues en atmosphère d'azote. Avec cet appareil, Harris (45) a obtenu une culture continue en anaérobiose pendant 173 générations.

* Polyoxyéthylène sorbitane monooléate.

D'après les travaux de Klein (46, 47), les cellules de levure cultivées en aérobiose contiennent beaucoup plus d'acides gras et de stérols que les cellules cultivées en anaérobiose. L'aération de ces dernières leur permet de synthétiser ergostérol et acides gras sans que la fraction non saponifiable ne correspondant pas aux stérols augmente d'une façon significative. La fraction non saponifiable, produite en absence d'oxygène, pourrait être une source de précurseurs d'ergostérol; Tchen et Bloch (48) ont montré que l'oxygène moléculaire est nécessaire à la formation du radical 3-hydroxyl du cholestérol, radical qui existe aussi dans la formule de l'ergostérol.

Nous avons comparé la croissance anaérobie des levures sur les deux milieux utilisés par Andreasen et Stier (7): milieu complexe à base d'extrait de levure et milieu synthétique de composition définie, contenant l'un et l'autre du Tween 80 et de l'ergostérol. Nous avons observé que le taux de croissance, la densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance et la densité optique atteinte à la fin de la multiplication sont bien supérieurs dans le cas du milieu à l'extrait de levure. Puis, en modifiant la composition du milieu synthétique, nous avons réussi à obtenir des cultures dont le taux de croissance est plus élevé et dont la densité cellulaire atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance est la même que dans le cas de cultures réalisées sur le milieu complexe à base d'extrait de levure.

A - Conditions de culture.

L'incubation se fait dans des récipients entièrement en verre Pyrex (figure 3) d'une capacité de 750 ml contenant 400 ml de milieu, ou d'une capacité de 6 litres contenant 2 litres de milieu, suivant la quantité de levure désirée. L'air est éliminé de l'appareil par un barbotage d'azote R (azote contenant moins de 0,005 % d'oxygène, fourni par la Société "Air Liquide") sous une pression de 4 cm de mercure, pendant l'heure qui précède et l'heure qui suit l'ensemencement. Le ballon de culture est muni d'une soupape à mercure (S) par où s'échappent l'azote et les gaz produits au cours de la croissance. Grâce à la tubulure latérale a (figure 3), il est possible, par aspiration à la trompe à eau, de faire les prélèvements destinés à établir les courbes de croissance. La culture est ensemencée sous courant d'azote à partir d'un inoculum prélevé pendant la phase exponentielle de croissance d'une

préculture anaérobie réalisée sur le même milieu que la culture. Cette préculture est elle-même ensemencée à partir d'une culture sur tube gélosé. L'incubation se fait à 25°.

Figure 3: Récipient utilisé pour les cultures anaérobies.

S: soupape au mercure;
a: tubulure permettant de faire des prélèvements.

B - Milieux de culture.

1- Culture sur milieu à base d'extrait de levure.

a) Composition du milieu:

Yeast Extract Difco 10 g, KH_2PO_4 1 g, $SO_4(NH_4)_2$ 1,2 g,
glucose anhydre 100 g, Tween 80 0,160 g, ergostérol 0,020 g,
~~ou~~ : ou: Tween 80 1,120 g, ergostérol 0,160 g,

eau distillée qsp 1.000 ml pH 5,6.

b) Courbes de croissance:

En faisant varier la concentration en Tween 80 et en ergostérol, il est possible d'obtenir des courbes de croissance anaérobie différentes (figure 4). Avec la plus forte concentration de Tween 80 et d'ergostérol, le taux de croissance ne varie pas, mais la phase exponentielle est plus longue et il y a passage brusque de la phase exponentielle à la phase stationnaire; ces conditions sont peu propices quand il s'agit d'effectuer plusieurs récoltes pendant la phase de

relentissement de la croissance, en vue d'observer l'évolution du spectre hématinique des cellules de levure .

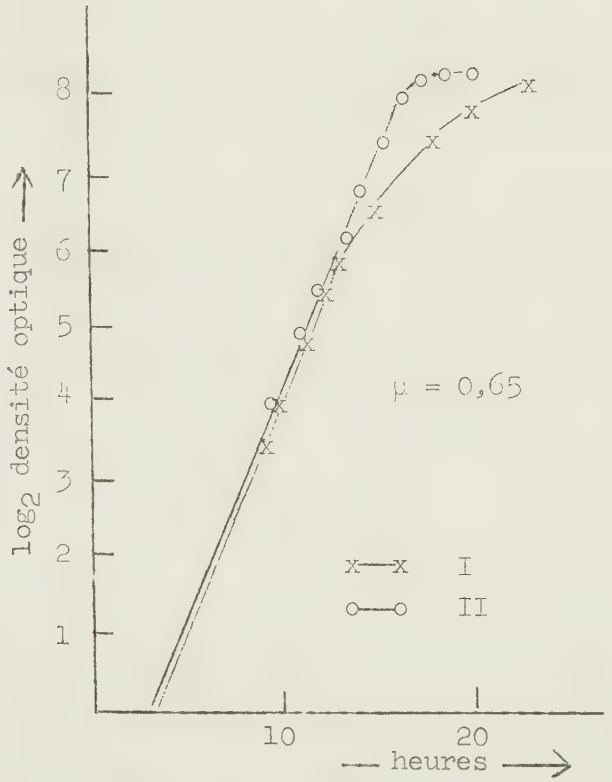


Figure 4: Courbe de croissance de la levure cultivée en anaérobiose stricte sur les milieux à base d'extrait de levure additionnés de:

I x—x ergostérol 20 μg/ml Tween 80 160 μg/ml

II o—o ergostérol 160μg/ml Tween 80 1.120 μg/ml.

2- Culture sur milieu synthétique. Mise au point de la composition de ce milieu.

a) Composition du milieu:

Des modifications dans la composition du milieu "Basal n°2" d'Andreasen et Stier (7-II)* ont été recherchées en vue d'obtenir un meilleur taux de croissance, une phase exponentielle plus longue et de pouvoir faire varier la longueur de la phase exponentielle en fonction de la concentration de la source d'azote.

* Le milieu d'Andreasen et Stier correspond lui-même à des modifications apportées au milieu "Difco Yeast Nitrogen Base" dont la composition a été établie par Wickerman(49)

La composition du milieu permettant la croissance dans les meilleures conditions est la suivante:

Sels minéraux: KI 0,100 mg, H_3BO_3 0,500 mg, $CuSO_4.5H_2O$ 0,0625 mg, Na_2MoO_4 0,150 mg, $FeCl_3.6H_2O$ 0,330 mg, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,715 mg, $MnCl_2.4H_2O$ 0,500 mg, NaCl 0,1 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,132 g, $MgSO_4.7H_2O$ 1 g, KH_2PO_4 3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 4 g.

Vitamines: d-biotine 0,016 mg, pantothénate de calcium 3,2 mg, nicotinamide 2,4 mg, thiamine,HCl 1,6 mg, pyridoxine,HCl 1,6 mg, mesoinositol 8 mg.

Tween 80 1,120 g, ergostérol 0,160 g

Tampon succinate pH 5,0 0,01 M

Glucose anhydre 100 g

Eau q.s.p. 1.000 ml.

b) Courbe de croissance:

La courbe de croissance d'une culture anaérobie réalisée sur ce milieu est donnée dans la figure 5. Le taux de croissance est égal à 0,5. La densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle est environ égale à 190 UC.

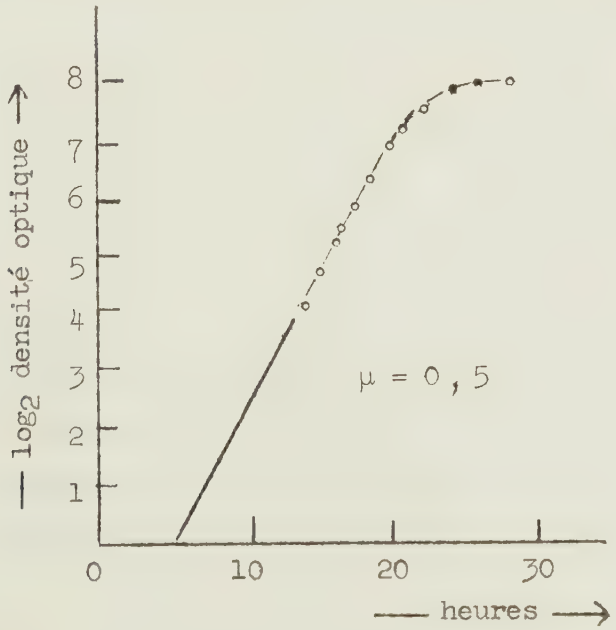


Figure 5: Courbe de croissance de la levure cultivée en anaérobiose stricte sur milieu synthétique.

Culture dans un ballon de 750 ml contenant 400 ml de milieu
Inoculum : 3,4 mg poids sec/litre.

c) Justification des modifications apportées au milieu "Basal n°2" de Andreasen et Stier:

- Addition de mésoinositol:

L'addition de mésoinositol au milieu de culture permet un démarrage plus rapide de la croissance et une phase exponentielle plus longue (Tableau I).

Tampon succinate	Mésoinositol	Taux de croissance	Densité optique (U.C.)
0,05 M	+	0,50	32
0,10 M	+	0,50	100
0,10 M	0	0,48	30

Tableau I : Effet de l'addition de mésoinositol et de la concentration en tampon succinate sur la densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance (milieu contenant: sulfate d'ammonium 0,2 %, Tween 80 0,016 %, ergostérol 0,002 %).

- Tampon succinate 0,10 M au lieu de 0,05 M:

Avec un tampon 0,05 M, le pH est facteur limitant de la phase exponentielle: il passe de 4,9 au début de la croissance à 3,7 à la fin de la phase exponentielle. Avec un tampon 0,10 M, le pH reste constant durant la phase exponentielle et durant la phase de ralentissement jusqu'à une densité optique de 180 U.C. pour une concentration de $(NH_4)_2SO_4$ de 0,4 %, de Tween 80 de 0,016% et d'ergostérol de 0,002 %.

- Influence de la concentration en $(NH_4)_2SO_4$:

Jusqu'à 0,4 %, $(NH_4)_2SO_4$ n'est pas facteur limitant de la phase exponentielle de croissance. La concentration de 0,7 % utilisée par Andreasen et Stier inhibe légèrement la croissance car le taux de croissance pour cette concentration est seulement de 0,45 (Tableau II).

$SO_4(NH_4)_2$	Tween 80 0,016 % Ergostérol 0,002 %		Tween 80 0,112 % Ergostérol 0,016 %	
g	d.o.	$\log_2$ d.o.	d.o.	$\log_2$ d.o.
0,05	50	5,64	50	5,64
0,1	70	6,13	75	6,23
0,2	100	6,66	112	6,83
0,4	124	6,95	188	7,55

Tableau II: Influence de la concentration en $(NH_4)_2SO_4$ en Tween 80 et en ergostérol sur la densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance.

- Influence de la concentration en Tween 80 et en ergostérol:

Pour une concentration en $(NH_4)_2SO_4$ de 0,4 %, les concentrations en Tween 80 (0,016 %) et en ergostérol (0,002 %) utilisées par Andreasen et Stier sont facteurs limitants de la phase exponentielle de croissance. Si on porte la concentration en Tween 80 à 0,112 % et celle en ergostérol à 0,016 %, la densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle passe de 124 U.C. à 188 U.C. Dans ce cas, quel est le facteur limitant?

d) Recherche du facteur limitant la phase exponentielle de croissance:

- Rôle du pH:

Le pH passe de 4,9 en phase exponentielle à 4,65 en phase de ralentissement, puis à 4,4 en phase stationnaire de croissance. Cette variation du pH n'est cependant pas le facteur limitant de la phase exponentielle. En effet, des cultures ajustée à pH 4,4 au départ présentent le même taux de croissance.

- Effet du rapport entre le volume du liquide et le volume du récipient de culture. Teneur en alcool du milieu:

Nous avons observé que le rapport entre le volume du liquide et le volume du récipient de culture intervient dans la durée de la phase exponentielle. En effet quand le rapport Volume du liquide/Volume total (v/V) est égal à 1/2, la phase exponentielle atteint une densité optique de 188 U.C. Elle atteint une densité optique de 230 U.C. pour v/V = 1/10. Nous avons essayé de déterminer la cause de cette différence de densité optique.

Le passage d'azote dans le récipient de culture à différents moments de la croissance en vue d'éliminer un corps volatil toxique, s'accumulant dans le cas de v/V = 1/2, ne prolonge pas la durée de la phase exponentielle.

Il est possible que le facteur limitant la phase exponentielle de croissance soit l'accumulation d'alcool dissous dans le milieu. Il a été établi que l'alcool à la concentration de 2% ralentit la croissance (50); or, la teneur en alcool dissous dans le milieu de culture que nous avons déterminée par la méthode de Friedman et Klaas (51) atteint cette valeur à la fin de la phase exponentielle dans le cas de v/V = 1/2 et de v/V = 1/10.

C - Conditions de récolte des levures cultivées en anaérobiose.

1- Récolte effectuée en vue d'une observation spectroscopique immédiate.

Après avoir refroidi dans un bain de glace le récipient contenant la culture, les cellules de levure sont récoltées par centrifugation de 5 minutes à 10.000 g, à une température comprise entre 0° et plus 4°.

Pour éviter la présence de bulles de CO_2 dans les préparations servant à l'étude spectrographique, la culture est additionnée, avant centrifugation, de fluorure de sodium 0,01 M. Il a été vérifié que le fluorure de sodium ne modifie pas les spectres cytochromiques.

2- Récolte effectuée en vue de manipulations ultérieures exigeant l'anaérobiose:

La culture de levure, après avoir été refroidie dans un bain de glace, est introduite dans les pots de centrifugeuse par pression à l'aide d'azote. Ceux-ci sont également placés dans un bain de glace et l'air en est chassé par un passage d'azote. Les pots de centrifugeuse sont remplis de la façon suivante (figure 6): les robinets 1 et 2 étant fermés, on remplace la soupape contenant le mercure par une soupape vide. Une bombe d'azote est branchée d'une part à cette soupape, d'autre part à un flacon barboteur contenant un peu d'eau et relié lui-même à une trompe à eau; ce flacon est muni d'un robinet 3 lui permettant de communiquer avec l'atmosphère.

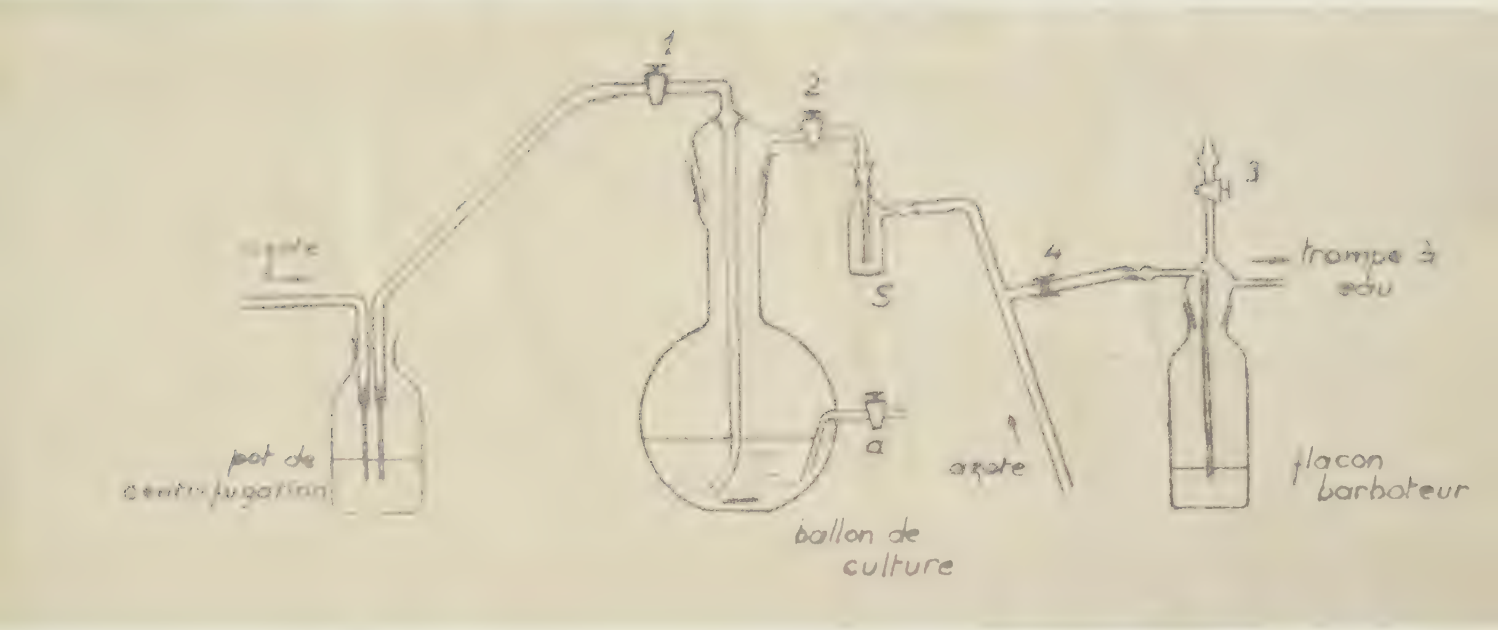


Figure 6: Dispositif utilisé pour le remplissage sous azote des pots de centrifugeuse.

- Purge de l'appareil: les robinets 1 et 3 étant fermés, on ouvre la trompe à eau, la pince 4, puis le robinet 2. Les gaz de fermentation de la culture sont aspirés, ce qui facilite l'élimination de l'air contenu dans la soupape et les tubes de caoutchouc.

- Introduction de l'azote dans le système: la trompe à eau étant toujours ouverte, on introduit une certaine pression d'azote. L'azote est d'abord entraîné par l'aspiration de la trompe. On fait ensuite communiquer très lentement, pour ne pas avoir de rentrée d'air, le robinet 3 avec l'atmosphère et on ferme progressivement le robinet de la trompe à eau. L'azote s'échappe alors par le robinet 3.

- Introduction de la culture dans les pots de centrifugeuse: on visse légèrement la pince 4, ce qui provoque une certaine pression d'azote dans le ballon de culture. Le liquide est déjà monté de quelques cm dans le tube central T du ballon. On ouvre le robinet 1 très lentement (le coton a été au préalable retiré de la tubulure et celle-ci a été munie d'un tube de caoutchouc), de façon à vérifier que le liquide monte dans le tube T. Le débit d'écoulement de la culture est déterminé par la pression d'azote réglée grâce à la pince 4. On ne

recueille pas dans le pot de centrifugeuse les 30 premiers ml de culture afin d'éliminer l'air contenu dans le tube de caoutchouc qui a été fixé sur le robinet 1. Une fois remplis, les pots de centrifugeuse sont fermés par un bouchon de caoutchouc souple: il y a toujours dans ces pots une certaine surpression due aux gaz de fermentation.

- Lavage des cellules par centrifugation: après centrifugation, le surnageant est éliminé par décantation sous courant d'azote. Le liquide, tampon phosphate ou eau distillée, destiné au lavage des cellules de levure, est contenu dans un ballon analogue au récipient de culture et a été au préalable refroidi et saturé d'azote. Ce liquide, d'un volume égal à celui de la culture, est introduit dans les pots de centrifugeuse contenant les culots de levure d'une façon identique à celle décrite pour le milieu de culture. Les levures sont remises en suspension par un violent courant d'azote.

Les cellules de levure ainsi récoltées à l'abri de l'air seront utilisées pour la préparation des particules subcellulaires de levures cultivées en anaérobiose.

C H A P I T R E II

TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROGRAPHIQUES

L'étude spectroscopique et spectrographique des pigments hématiniques des cellules entières et des fractions cellulaires a été réalisée à la température ordinaire et à la température de l'azote liquide (-190°). La technique d'étude spectrale à basse température a été appliquée pour la première fois à l'étude des cytochromes par Keilin et Hartree en 1947 (52). Elle permet d'obtenir une meilleure résolution du spectre hématinique par suite du ralentissement des vibrations intramoléculaires. Les bandes d'absorption sont mieux définies qu'à la température ordinaire; elles deviennent également plus intenses. De plus, le refroidissement provoque un léger déplacement des sommets des bandes vers les courtes longueurs d'ondes.

Grâce à l'étude spectrale à basse température, il nous a été possible de dissocier des bandes d'absorption confondues à la température ordinaire et de déceler l'existence de pigments en trop faible concentration pour que leurs bandes d'absorption apparaissent à la température ordinaire.

Une étude spectrale à la température de l'hydrogène liquide (-260°) nous a montré que la résolution du spectre des levures cultivées en aérobiose et en anaérobiose reste sensiblement la même qu'à la température d'azote liquide; les bandes d'absorption deviennent seulement encore plus étroites et plus intenses. Nous nous sommes donc contentés de travailler à la température de l'azote liquide.

Nous nous sommes surtout attachés à l'étude des bandes α des cytochromes, situées au-delà de 550 mμ. Dans certains cas, où la concentration des pigments est élevée, nous avons pu déterminer l'emplacement des bandes β beaucoup moins intenses, situées vers 520 mμ. Quant aux bandes γ, leur étude est surtout intéressante dans le cas des cytochromes isolés car dans les cellules entières ou dans les particules

subcellulaires, les bandes γ des différents cytochromes sont généralement plus ou moins confondues.

I - PREPARATIONS SERVANT AUX ETUDES SPECTRALES.

Les études spectrales sont faites sur des pâtes ou sur des suspensions très denses placées dans des cuves constituées d'un anneau maintenu entre deux disques de plexiglas grâce à un cadre de laiton. Le diamètre intérieur de l'anneau varie entre 5 et 10 mm, suivant la quantité de matériel dont on dispose. Le choix de l'épaisseur de l'anneau dépend de la nature de la préparation et de la température à laquelle on l'examine: pour les études à basse température, l'épaisseur optima des préparations est toujours inférieure à l'épaisseur optima des préparations permettant l'étude à température ordinaire; c'est ainsi, par exemple, qu'une préparation étudiée à la température ordinaire avec une épaisseur de 1,5 à 2 mm, sera observée sous 0,8 à 1 mm à la température de l'azote liquide.

Pour refroidir les préparations, la cuve est trempée dans de l'azote liquide contenu dans un vase Dewar. Dès que l'équilibre de température est atteint la préparation est retirée et rapidement examinée au spectroscope ou spectrographiée; dans ce dernier cas, si le temps de pose dépasse 15 secondes, il est nécessaire de replonger la préparation dans le vase Dewar.

II - EXAMEN SPECTROSCOPIQUE.

Le spectroscope utilisé est le spectroscope de poche Zeiss. La source lumineuse est constituée par une lampe à incandescence de 500 watts placée au foyer d'une lentille de 10 cm de diamètre. Les rayons lumineux ainsi rendus parallèles arrivent sur une deuxième lentille au foyer de laquelle se trouve la préparation étudiée. L'observation spectroscopique permet de déceler les bandes d'absorption situées dans le visible, de déterminer leur position à 1 ou 2 mμ près et d'apprécier l'action des différents réducteurs sur les spectres cytochromiques avant de plonger les préparations dans l'azote liquide.

III - TECHNIQUE SPECTROGRAPHIQUE.

L'étude spectrographique des cytochromes a été réalisée suivant la technique décrite par Chaix et Fromageot (53) et par Chaix et Petit (42). Nous la rappelons brièvement.

A - Spectrographie.

La préparation éclairée comme pour l'observation spectroscopique, est placée devant la fente d'un spectrographe (Spectrographe du type A de la Société Générale d'Optique). Sur une même plaque (plaque micropanchro Lumière) on photographie dans les mêmes conditions, d'une part la préparation et, d'autre part, des écrans neutres (Wratten Kodak) de densité connue. Ces écrans constituent une échelle de référence recouvrant l'ensemble des densités correspondant au spectre de la préparation. Ils permettent, en outre, de corriger les variations de sensibilité des plaques photographiques en fonction de la longueur d'onde. La densité optique de chacun de ces écrans ne dépassant pas 2, il est nécessaire d'en accoler plusieurs pour obtenir des fortes densités optiques, comprises entre 2 et 4, rencontrées dans l'étude des milieux troubles. L'étalonnage des écrans est effectué avec un spectrophotomètre Beckman DU.

Pour obtenir des longueurs d'onde de référence, on superpose à chaque spectre (écrans et préparation) le spectre du mercure. Dans la région étudiée, les raies servant de repère sont celles situées à 546 mμ, 577 mμ et 579 mμ. La lumière issue de la lampe à vapeur de mercure est dirigée, grâce à un miroir, sur la fente du spectrographe devant laquelle est placé un diaphragme réglable. La préparation est photographiée avec et sans raies du mercure, celles-ci pouvant interférer avec les bandes d'absorption.

Le choix de l'épaisseur (e) de la préparation et du temps de pose pour lesquels le noircissement des plaques donnera le meilleur enregistrement est déterminée par tâtonnement en prenant quelques clichés sur une plaque préliminaire.

B - Enregistrement.

Les noircissements des spectres photographiés sont ensuite traduits en courbes grâce au microphotomètre enregistreur de Moll (Kipp et Zonen, Delft, Hollande). La courbe de noircissement de la préparation est ensuite traduite en

courbe de densité en comparant, pour chaque longueur d'onde (déterminée par rapport à l'emplacement des raies de mercure en se référant à la courbe de dispersion du spectrographe), le noircissement du spectre avec le noircissement des écrans de référence spectrographiés dans les mêmes conditions.

C - Renseignements fournis par cette méthode.

Cette technique spectrographique est applicable aux milieux troubles, fortement diffusants, renfermant des pigments en faible concentration. Elle permet d'obtenir une courbe des variations de la densité optique d'une préparation en fonction de la longueur d'onde. Mais chacune de ces densités optiques correspond à la somme de la diffusion et de l'absorption. Les phénomènes de diffusion, dûs à l'hétérogénéité du milieu, varient suivant la taille et la nature des particules en suspension; ils sont beaucoup plus intenses que les phénomènes d'absorption. Pour que l'absorption se manifeste avec suffisamment de netteté, il est nécessaire d'utiliser des suspensions dont la densité optique est comprise entre 2,5 et 4. Dans ces conditions, la loi de Beer-Lambert n'est pas valable. Mais si cette spectrographie en milieu trouble ne permet pas de déterminer la teneur en pigments, elle permet d'apprécier les proportions relatives des différents pigments et de fixer d'une façon précise (à 0,5 mμ près) la position des sommets des bandes d'absorption. Cette technique nous a permis, au laboratoire (54, 55), d'enregistrer les bandes d'absorption de pigments qui n'avaient pas été observés dans le même matériel, même à la température de l'azote liquide, par d'autres auteurs utilisant une méthode moins sensible.

Remarque: Pour déterminer approximativement la teneur des cellules en pigments, certains auteurs (33, 82, 35) ont utilisé une méthode qui consiste à comparer à la température ordinaire l'absorption d'un cytochrome in situ avec l'absorption d'un cytochrome ajouté en concentration connue à une préparation cellulaire dépourvue de pigment (préparation obtenue par exemple par chauffage et oxydation par l'eau oxygénée (35)). Les raisons principales pour lesquelles nous n'avons pas appliqué cette méthode sont les suivantes: 1)pour que le dosage soit possible, il est nécessaire que l'absorption à la longueur d'onde étudiée ne soit due qu'à un seul pigment, or, dans les cas où il eut été intéressant au cours de notre étude d'apprécier les variations de concentration d'un seul cytochrome, cette condition n'a pu être réalisée (voir deuxième partie, Chapitre I); 2) par notre technique spectrographique il est difficile de

déterminer avec précision la hauteur de bandes d'absorption aussi peu intenses à la température ordinaire que celles des préparations de cellules entières de levure; ces bandes sont beaucoup plus intenses à basse température mais la cristallisation variant d'une préparation à l'autre, la diffusion varie également ce qui introduit un facteur d'erreur supplémentaire.

Grâce à un outillage spectrophotométrique exceptionnellement sensible que nous n'avions pas à notre disposition, Chance a réussi à doser la faible quantité de pigment hématinique présent dans des suspensions dont la densité optique est inférieure à 1, donc peu diffusante; cette faible diffusion peut être éliminée par la méthode des spectres de différence permettant de mesurer la variation de densité optique entre deux états d'une préparation par exemple, entre les formes réduites et oxydées des pigments (56).

IV - PREPARATION DES HEMOCHROMES DE PYRIDINE.

La position des bandes d'absorption des cytochromes dépend à la fois de la nature du groupement prosthétique, de la nature de la protéine et de leur mode de liaison. Or, dans un certain nombre de cas, le groupement prosthétique peut se combiner avec une base azotée telle que la pyridine et donner un spectre caractéristique du groupement prosthétique entrant en réaction (57).

Nous avons préparé les hémochromes de pyridine de la façon suivante: 5 ml d'une suspension de levure à 40 % sont additionnés de 2 ml de KOH 0,1 N et de 1,5 ml de pyridine pure, puis de quelques mg d'hydrosulfite de sodium. Ce mélange est ensuite centrifugé 10 minutes à 5.000 rpm. L'étude spectrographique est faite sur le culot ainsi obtenu.

C H A P I T R E III

TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT DES CELLULES DE LEVURE

Dans la plupart des cas, nous avons réalisé le fractionnement des cellules de levure après avoir détruit la paroi cellulaire par digestion enzymatique. Les différents stades de fractionnement ont été contrôlés par un examen au microscope à contraste de phase et, dans certains cas, les particules ont été étudiées par micrographie électronique. Dans quelques cas, le fractionnement a été effectué après broyage direct des cellules par un moyen purement mécanique.

I - FRACTIONNEMENT APRES DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE.

La paroi de la cellule de levure est particulièrement résistante. Il est très difficile de la rompre sans altérer les mitochondries. La méthode qui nous a donné les meilleurs résultats quant à l'intégrité morphologique des particules, consiste à préparer des protoplastes par digestion enzymatique de la paroi des cellules de levure récoltées en phase exponentielle de croissance, puis à les broyer par un moyen mécanique relativement doux. L'homogénat ainsi obtenu est ensuite fractionné par centrifugation différentielle.

A - Préparation des protoplastes.

Le suc (SHP) contenu dans le tractus gastro-intestinal d'Helix pomatia [*] est très riche en enzyme d'hydrolyse des polysaccharides (58) entrant dans la constitution de la paroi de la cellule de levure. Celle-ci contient, en effet, d'après Roeflosen (59), Northcote et Horne (60), 60 à 70% de mannane et de glucane, environ 1% de chitine et 6 à 13 % de protéines.

[*] Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur M. Jayle pour les quantités importantes de suc digestif d'Helix pomatia qu'il nous a très aimablement procurées.

L'action du suc digestif d'Helix pomatia (SHP) sur la paroi de levure a d'abord été observée par Giaja en 1922 (61). Puis, en 1957, Eddy et Williamson (62) l'ont utilisé pour obtenir des protoplastes, c'est-à-dire des cellules dépourvues de paroi, limitées par la seule membrane cytoplasmique et sensibles aux chocs osmotiques. Les conditions de préparation des protoplastes mises au point par ces auteurs sont les suivantes: les cellules de levure sont mises en suspension à raison de 10^8 cellules par ml, dans un tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 5,8, additionné de rhamnose 0,55 M et de 1 mg/ml de suc digestif lyophilysé. La digestion dure 5 heures à 25°.

Pour diminuer la durée d'incubation, tout en utilisant une plus faible quantité de suc digestif, nous avons modifié les conditions réalisées par Eddy et Williamson. Pour cela, nous avons déterminé exactement le stade de la croissance pour lequel la membrane est attaquée le plus facilement et nous avons étudié l'action du suc digestif dans différents milieux pour différentes concentrations cellulaires. Le contrôle de la dégradation de la membrane a été fait par examen au microscope à contraste de phase.

1- Etude de l'action du SHP à différents stades de la croissance des cultures.

Les levures cultivées en aérobiose sur milieu à l'extrait de levure * sont récoltées à différentes phases de leur croissance et lavées par centrifugation dans la solution tampon phosphate-citrate 0,05 M, pH 5,8 + lactose 0,25 M. Elles sont ensuite remises en suspension dans le même milieu à raison de 1,88 mg, poids sec de levure par ml ($1,25.10^8$ cellules/ml). L'incubation est faite à 25° pendant 35 minutes en présence de deux concentrations de SHP: 0,025 ml/ml et 0,0125 ml/ml de suspension. Cette suspension est ensuite broyée 5 minutes au "Virtis homogenizer 45", le rhéostat de cet appareil étant à 50 (cet appareil possède un axe muni d'un couteau en acier qui tourne dans le récipient contenant la suspension. Quand le rhéostat est à 100, l'axe tourne dans l'eau à 45.000 rpm).

* Nous avons observé, en collaboration avec L. Ohaniance, l'influence de la composition du milieu de culture sur la constitution de la membrane cellulaire; celle-ci n'est pratiquement pas attaquée par le suc digestif quand la culture est réalisée sur un milieu synthétique constitué de sels minéraux, de vitamines (biotine, pantothénate de calcium, inositol, thiamine, pyridoxine) de glucose et de tampon citrate (44).

L'efficacité de l'opération est appréciée d'après le pourcentage des cellules entières restantes.

Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

Densité optique de la culture U.C.	SHP ml/ml de suspension de levure	% cellules entières après action du Virtis
15	0,0125	20
	0,0250	0
45	0,0125	10
	0,0250	0
120	0,0125	50
	0,0250	30
243	0,0250	90

Tableau III: Action du SHP à différents stades de la croissance de culture.

Nous voyons que l'efficacité de la lyse est optima quand il s'agit de levures récoltées au milieu de la phase exponentielle de croissance. Pour une densité optique de la culture de 120 U.C., le rendement est beaucoup plus faible, comme si la constitution de la membrane se modifiait au cours de la dernière division de la phase exponentielle.

Des résultats analogues sont obtenus avec des cellules de levure cultivées en anaérobiose.

2- Etude des conditions optima de la digestion de la paroi des levures par SHP.

Le tampon citrate-phosphate utilisé par Eddy et Williamson ne convient pas pour la préparation des mitochondries, car il complexe les ions divalents nécessaires à leur activité.

Nous avons déterminé le pH optimum de l'activité du SHP vis-à-vis de la membrane de levure, dans le tampon maléate (63). La digestion est optima à pH 5,5 pour une suspension contenant 10^8 cellules/ml dans le tampon maléate M/50, lactose 0,25 M [*], la concentration du SHP étant de 0,025 ml/ml de suspension. Pour des concentrations cellulaires plus élevées (3.10^8, 7.10^8 et 2.10^9 cellules par ml), réalisées dans le tampon M/50, le pH ajusté à 5,8 au début de l'incubation, descend à 5,3 à la fin de l'incubation. Avec un tampon plus concentré, M/20 par exemple, le pH reste constant au cours de l'incubation, mais les protoplastes se contractent.

Si la digestion a lieu simplement dans une solution de lactose 0,25 M, la variation de pH est la même que dans le tampon M/50 et il est donc inutile de tamponner le milieu.

Il est à noter que les pH optimum donnés par Myers et Northcote (59) de l'activité hydrolysante du SHP vis-à-vis de la mannane et de la glucane de levure sont respectivement de 5,0 et 5,5.

La concentration du SHP étant de 0,025 ml/ml de suspension, le résultat de la digestion est le même, soit après 30 minutes d'incubation pour une suspension de 10^8 cellules/ml, soit après 1 heure d'incubation pour une suspension de 8.10^8 cellules/ml, soit après 90 à 100 minutes d'incubation pour une suspension de $2,5.10^9$ cellules/ml (34 mg poids sec/ml). C'est cette dernière concentration que nous avons adoptée.

3- Technique de préparation des protoplastes.

A la suite des différentes mises au point qui viennent d'être décrites, nous avons adopté la technique suivante:

- les cellules de levure cultivées en aérobiose ou en anaérobiose, sur milieu complexe à l'extrait de levure, sont récoltées en phase exponentielle de croissance; elles sont ensuite lavées par centrifugation dans le même volume d'eau distillée

[*] Nous avons choisi le lactose, car ce sucre n'est utilisé ni au cours de la respiration, ni au cours de la fermentation chez Saccharomyces cerevisiae, comme nous l'avons vérifié pour la souche Yeast Foam.

glacée que le volume de la culture; puis, le culot de centrifugation est remis en suspension dans le lactose 0,25 M à raison de 34 mg poids sec de levure/ml. Cette suspension est additionnée, par ml, de 0,025 ml de SHP et mise à incuber 90 minutes à 25°. Dans le cas de levures cultivées en anaérobiose, l'incubation est réalisée sous un passage d'azote dont le débit doit être très faible afin d'éviter la formation de mousses.

Bien qu'étant récoltées en phase exponentielle de croissance, les cellules de levure dont les divisions ne sont évidemment pas synchrones, ne sont pas toutes attaquées à la même vitesse: la suspension contient de nombreux protoplastes, des cellules dont la paroi est partiellement digérée et des débris cellulaires provenant, sans doute, de protoplastes attaqués par les protéases du mélange enzymatique. A pH 5,3 (58) toutefois, cette action protéolytique du SHP est minimum.

Cette suspension est centrifugée 10 minutes à 4.000 g; le surnageant contenant les débris cellulaires est éliminé; le culot est remis en suspension dans le lactose 0,5 M et centrifugé 10 minutes à 3.000 g (centrifugeuse Runne, Munich); le surnageant est éliminé; le culot, dont le SHP a été éliminé, est essentiellement constitué de cellules plus ou moins intactes et de protoplastes.

B - Broyage des protoplastes.

1- Milieu utilisé pour le broyage des protoplastes.

Pour le broyage, les protoplastes récoltés par centrifugation dans le lactose 0,5 M, sont remis en suspension, à raison de 5 fois leur volume environ, dans une solution à 7,5 % de polyvinylpyrrolidone (PVP); cette dilution porte approximativement la concentration du lactose à 0,1 M. Le PVP nous a été fourni par la Société Rhône-Poulenc. Il doit être dialysé afin d'éliminer des impuretés, notamment des impuretés métalliques qui inhibent partiellement la respiration des cellules de levure et sont donc susceptibles d'inhiber la respiration des mitochondries isolées(TableauIV)

Le PVP a été utilisé par différents auteurs comme milieu d'isolement de particules subcellulaires. Zajdela et Morin (64) ont réussi à obtenir dans le PVP des noyaux de cellule hépatique proches de leur état physiologique. Pour préparer des particules subcellulaires de cerveau, foie et tumeur de souris, Woods (65) a utilisé une solution contenant 10% de PVP et 20% de saccharose. Cet auteur a en effet observé

que le PVP empêche l'agglutination des microsomes et facilite ainsi la centrifugation différentielle des constituants cellulaires. Novikoff (66) a comparé les caractéristiques morphologiques des mitochondries de foie de rat préparées dans le saccharose iso- et hypertonique ou dans le mélange PVP-saccharose et il a constaté que dans ce dernier milieu, les mitochondries conservaient plus longtemps leur forme allongée et une densité uniforme, ce qui laisse supposer qu'elles n'ont pratiquement pas perdu de constituants durant leur isolement. De plus, par une étude de la distribution dans les fractions subcellulaires de différents enzymes, catalase, isocitrico-déshydrogénase et pyrophosphatase inorganique (67, 68), il a été montré que les mitochondries isolées dans le milieu PVP-saccharose retiennent mieux ces enzymes que les mitochondries isolées dans le saccharose seul.

Nous-mêmes avons observé que les mitochondries de levure cultivée en aérobiose, préparées dans le lactose 0,5 M, sont gonflées et rondes comme des mitochondries de foie de rat préparées dans le saccharose 0,25 M, tandis que le milieu PVP-lactose préserve leur forme allongée. Nous verrons plus loin que ce milieu empêche le départ dans la fraction soluble de constituants intramitochondriaux.

Addition au milieu	Q_{O_2}	
0	38,5	39,0
PVP 3,25 %	19,8	20,5
EDTA 2.10^{-4}M	41,5	41,7
PVP 3,25 % EDTA 2.10^{-4}M	45,0	47,0
PVP 3,25 % dialysé	44,0	40,2

Tableau IV: Influence du PVP sur la respiration des cellules de levure.
Cellules de levure récoltées en phase exponentielle de croissance sur milieu à l'extrait de levure, (d.o. = 45 U.C.)
Milieu de respiration: tampon phosphate 0,033 M pH 4,6 + Glucose 0,015 M
Q_{O_2} = µl O_2 consommés par heure et par mg poids sec. Q_{O_2} calculé d'après les lectures des manomètres entre 30 minutes et 60 minutes d'incubation dans le bain-marie.

Tableau V: Préparation des fractions subcellulaires de levures récoltées en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie.

Cellules de levure récoltées quand la densité optique de la culture est comprise entre 50 et 80 U.C

Lavage des cellules dans l'eau.

Suspension contenant 34 mg de levure, poids sec/ml dans lactose 0,25 M.

↓

Digestion 90 minutes par SHP 0,025 ml/ml

↓

Centrifugation 10 minutes 4.000 g

├——— surnageant éliminé

Culot remis en suspension dans lactose 0,5 M

↓

Centrifugation 10 minutes 3.000 g

├——— surnageant éliminé

Culot remis en suspension dans PVP 7,5 %

↓

Broyage au Virtis — 10 minutes rhéostat 75 / 10 minutes arrêt / 10 minutes rhéostat 75

↓

Centrifugation 20 minutes 1.000 g

├——— culot éliminé

Surnageant (suspension 3)

↓

Centrifugation 30 minutes 4.000 g

├——— culot: fraction mitochondriale (A_1 ou N_1)

Surnageant

↓

Centrifugation 45 minutes 25.000 g

├——— culot: fraction intermédiaire (A_2 ou N_2)

Surnageant

↓

Centrifugation 60 minutes 105.000 g

├——— culot: fraction ribosomique (A_3 ou N_3)

Surnageant.

2- Technique de rupture des protoplastes.

Le broyage des protoplastes est effectué au "Virtis homogenizer 45". Dans le cas de levures cultivées en anaérobiose, la suspension est placée dans un récipient à tubulure latérale permettant un passage d'azote. Le broyage se fait à vitesse moyenne (rhéostat à 75), en deux fois: chacun de ces deux broyages, séparés par un arrêt de 10 minutes, dure 10 minutes .L'intervalle entre les deux broyages a pour but de faciliter la pénétration du milieu dans les cellules déjà entamées: les particules cellulaires sont ainsi libérées plus facilement.

Après cette opération la plupart des protoplastes sont éclatés. La suspension contient surtout des particules subcellulaires, des débris de membranes et des cellules entières.

C - Séparation des particules.

Les cellules entières et les gros débris sont éliminés par une centrifugation de 20 minutes à 1.000 g * effectuée avec une centrifugeuse de marque "Runne". L'homogénat (suspension S) est ensuite préparé en trois fractions (A_1, A_2, A_3 isolées à partir des levures cultivées en aérobiose ou N_1, N_2, N_3 isolées à partir des levures cultivées en anaérobiose), sédimentant respectivement à 4.000 g (30 minutes), 25.000 g (45 minutes) et 105.000 g (90 minutes); la première centrifugation est effectuée avec la centrifugeuse Runne et les deux dernières avec la centrifugeuse "Spinco préparative".

Les différentes opérations conduisant à l'obtention de ces fractions sont résumées dans le Tableau V.

II - BROYAGE MECANIQUE DIRECT DES CELLULES DE LEVURE.

C'est la méthode de broyage à partir des protoplastes qui vient d'être décrite qui a été le plus généralement utilisée au cours de ce travail. Cependant, dans certains cas, nous avons voulu comparer les propriétés oxydatives des particules obtenues à partir des protoplastes avec celles des particules homologues préparées par un procédé plus rapide préservant peut-être mieux certaines activités enzymatiques.

* Les g indiqués correspondent à la force centrifuge relative au niveau du milieu du tube de centrifugation.

Comme, d'autre part, nous avons vu que le suc digestif d'Helix pomatia n'agit que sur la paroi des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance, le broyage des cellules récoltées en phase stationnaire de croissance n'a pu être réalisé que par un moyen mécanique direct.

Nous avons d'abord essayé d'effectuer le broyage des cellules avec le "Virtis homogenizer 45". Mais cette opération n'est possible qu'en présence de billes de verre (ballotini) qui pulvérisent partiellement le couteau en acier inoxydable en une abondante poudre noire dont il est impossible de se débarrasser même après des centrifugations répétées. Nous avons alors utilisé un appareil apparenté au broyeur de levures de Nossal (69), le "Zell Homogenisator" (70), fabriqué par la Société Braun. Le récipient d'une capacité de 75 ml contenant la suspension de cellules de levure et de billes de verre est fermé hermétiquement par un bouchon rôdé. Il est placé dans un cylindre métallique animé d'un mouvement de va-et-vient dont la fréquence peut être de 2.000 ou 4.000 périodes par minute. Ce cylindre se déplace à l'intérieur d'une enceinte dans laquelle il est installé de façon excentrique. Le récipient est refroidi par détente de neige carbonique dans le cylindre. Le broyage est effectué de la façon suivante: les cellules de levure récoltées par centrifugation sont remises en suspension dans un milieu dont la composition, variant suivant les expériences, sera indiquée pour chacune d'entre elles; 15 ml de suspension sont additionnés de 15 ml de ballotini n°8; le broyage dure environ 2 à 3 secondes à la vitesse n°1 (2.000 périodes/minute), puis 45 secondes à la vitesse n°2 (4.000 périodes par minute). Le rendement en cellules broyées varie suivant la composition du milieu utilisé. Il est environ de 90% dans le tampon phosphate pH 7 0,2 M, de 50 à 60 % dans le lactose 0,5 M et de 30 à 40 % dans le mélange PVP 7,5 % + lactose 0,1 M.

Les conditions de séparation des particules seront indiquées dans chaque cas particulier.

C H A P I T R E IV

AUTRES TECHNIQUES UTILISEES

I - TECHNIQUES MANOMETRIQUES.

La mesure de la respiration des cellules entières et des fractions cellulaires a été faite par lá méthode manométrique directe de Warburg (71). Les récipients utilisés d'une capacité de 15 ml environ contiennent suivant les cas 2 ou 3 ml de liquide; ils sont munis d'une ou deux ampoules latérales et d'une ampoule centrale. L'ampoule centrale contient 0,2 ml de solution de KOH à 30% destinée à fixer le CO_2 dégagé; un petit morceau de papier filtre exempt d'amidon, plissé, plongé dans la potasse, augmente la surface d'absorption. Pour les mesures effectuées avec les levures cultivéds en anaérobiose, dégageant une grande quantité de CO_2, il est nécessaire de mettre de plus, dans une ampoule latérale, 0,1 ml de la solution de KOH à 30% en même temps qu'un petit morceau de papier filtre (72). Les mesures sont effectuées à 27°. L'agitation des manomètres est de 120 oscillations par minute avec une course de 2 cm.

La consommation d'oxygène est rapportée au mg poids sec de levure quand il s'agit de cellules entières et au mg de protéine quand il s'agit de fractions cellulaires.

Q_{O_2} = nombre de mm^3 absorbés pendant 1 heure, par mg poids sec ou par mg de protéine, suivant le cas.

II - DOSAGE DES PROTEINES.

A - Méthode de dosage.

Nous avons dosé les protéines par la méthode de Lowry et coll. (73) en prenant le lysozyme pour établir la courbe étalon. Selon cette méthode, les acides

aminés aromatiques des protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu en donnant une coloration qui permet leur dosage. Elle permet de doser des concentrations en protéines de quelques µg, mais les valeurs obtenues diffèrent suivant les protéines auxquelles on se réfère.

Nous avons aussi effectué quelques dosages par la méthode du biuret (74) afin de comparer certains de nos résultats avec ceux d'autres auteurs qui utilisent cette dernière méthode. La méthode du biuret, basée sur la formation de complexes cuivre-polypeptides, est moins sensible que la méthode de Lowry (la quantité de protéines par essai doit être au moins égale à 1 mg), mais les valeurs obtenues diffèrent peu, quelle que soit la protéine de référence.

Le Tableau VI donne les concentrations en protéines, mesurées par les deux méthodes, de deux suspensions de particules subcellulaires, les protéines de référence étant le lysozyme* et la sérumalbumine**. On voit que les valeurs obtenues par la méthode de Lowry sont beaucoup plus élevées que celles obtenues par la méthode du biuret.

Protéine de référence	Méthode de Lowry		Méthode du biuret		$\frac{A_1 (Lowry)}{A_1 (biuret)}$	$\frac{A_2 (Lowry)}{A_2 (biuret)}$
	A_1	A_2	A_1	A_2		
	Protéines (mg/ml)		Protéines (mg/ml)			
Sérumalbumine	5,58	2,10	3,20	1,22	1,74	1,72
Lysozyme	4,14	1,64	3,01	1,18	1,37	1,39
$\frac{\text{Protéine par rapport à la sérumalbumine}}{\text{Protéine par rapport au lysozyme}}$	1,35	1,28	1,06	1,03		

Tableau VI: Dosage des protéines, soit par la méthode de Lowry, soit par la méthode du biuret.
A_1 : suspension de particules subcellulaires sédimentant à 4.000 g
A_2 : suspension de particules subcellulaires sédimentant à 25.000 g

* Worthington Biochemical Corporation

** Sérumalbumine bovine - Fraction V Armour.

Nous avons préféré la méthode de Lowry, car elle permet, en particulier, de doser les protéines d'une suspension de particules dont la concentration est trop faible pour que la méthode du birret soit utilisable.

C'est le cas des suspensions de particules contenues dans chacun des récipients ayant servi aux mesures manométriques. Il vaut mieux en effet doser les protéines dans chacun des récipients plutôt que dans la suspension mère des particules difficile à rendre homogène sans altérer les structures mitochondriales.

B - Détermination de la teneur en protéines des cellules de levure.

La teneur en protéines des cellules de levure récoltées en phase exponentielle de croissance a été déterminée de la façon suivante:
- les cellules (1.415 g poids sec) ont été mises en suspension dans 8 ml d'eau et additionnées de 8 ml de ballotini n°8. Après un broyage effectué avec le Zell Homogenizator en deux fois une minute à la vitesse maximum, il ne reste pas de cellules entières dans la suspension. L'homogénat (additionné des eaux de lavage des ballotini) est centrifugé 20 minutes à 5.000 g rpm. L'examen au microscope du culot de centrifugation révèle qu'il est constitué d'un mélange de débris de parois cellulaires et de parois qui ont gardé une forme plus ou moins arrondie mais qui semblent vidées de leur contenu. En vue d'obtenir la libération complète de toutes les protéines intracellulaires, ce culot est à nouveau broyé. Après le dernier broyage les parois sont totalement brisées. Le dosage des protéines est effectué d'après la méthode de Lowry sur l'homogénat total et sur la suspension de membranes avant et après broyage.

Les résultats sont les suivants:

Poids sec des levures	1.415 mg
Protéines de l'homogénat	699 mg
Protéines des membranes	
avant broyage	34,3 mg
après broyage	35 mg

Les protéines totales représentent donc 49,4 % du poids sec: 5 % des protéines proviennent des membranes, le résultat est le même avant et après broyage des membranes.

III - DOSAGE DE L'ACTIVITE LACTICODESHYDROGENASE.

L'activité lacticodéshydrogénase est mesurée sur les fractions subcellulaires en suivant la réduction du ferricyanure de potassium en présence de DL-lactate au spectrophotomètre Beckman DU à 420 mμ - à la température de 27°(75).

Le volume du mélange réactionnel contenu dans une cuve de 1 cm de trajet optique est égal à 3 ml. Dans la cuve, les concentrations des réactifs sont les suivantes:

Tampon phosphate	$0,66.10^{-2}$M	
Ferricyanure de potassium	$0,66.10^{-3}$M	(2 μmoles)
DL-lactate d'ammonium*	$1,66.10^{-2}$M	

Dans ces conditions, sans addition d'enzyme, la densité optique du mélange réactionnel est égale à 0,680 (le zéro étant établi avec de l'eau). A 420 mμ, le coefficient d'extinction molaire du ferricyanure de potassium est égal à $1,04.10^{3}$; à cette longueur d'onde, l'absorption du ferrocyanure est négligeable (26). L'activité spécifique représente le nombre de μmoles de ferricyanure réduites par heure, par mg de protéine, les protéines étant dosées par la méthode de Lowry (73).

La variation d'extinction est linéaire pendant les 5 premières minutes après l'addition d'enzyme; elle est proportionnelle à la concentration de l'enzyme.

*Préparé par neutralisation par NH_4OH de l'acide DL-lactique fourni par British Drug House Ltd.

D E U X I E M E P A R T I E

ETUDE *IN SITU* DE L'EQUIPEMENT CYTOCHROMIQUE DES CELLULES DE LEVURE CULTIVEES EN AEROBIOSE ET EN ANAEROBIOSE.

Dans un premier chapitre, nous décrirons l'évolution du spectre d'absorption par spectrographie à basse température, de la levure cultivée en aérobiose ou en anaérobiose en fonction des phases de sa croissance.

Dans un deuxième chapitre, nous préciserons les transformations subies par le spectre de la levure cultivée en anaérobiose, au cours de l'aération des cellules non proliférantes.

Sauf mention spéciale, les spectres ont été observés sans addition de réducteur, leur réduction étant effectuée par les substrats propres de la cellule. Dans le cas des cellules cultivées en aérobiose, l'oxygène présent dans les préparations utilisées pour les études spectrales est rapidement consommé.

Pour essayer de classer les pigments observés d'après la constitution de leur groupement hématinique, nous avons déterminé le spectre de leur hémochrome de pyridine.

CHAPITRE I

VARIATIONS DU SPECTRE CYTOCHROMIQUE DE LA LEVURE EN FONCTION DE SES PHASES DE CROISSANCE

Au cours de ce chapitre, nous étudierons successivement le spectre de la levure cultivée en aérobiose et celui de la levure cultivée en anaérobiose.

I - CAS DE LA LEVURE CULTIVEE EN AEROBIOSE.

D'après Keilin, le refroidissement à basse température provoque dans le spectre d'absorption de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose, d'une part un déplacement des bandes d'environ 5 mμ vers les courtes longueurs d'onde et d'autre part, une meilleure résolution faisant apparaître une bande à 552 mμ ($c_1\alpha$).

Le spectre de la souche utilisée au cours de ce travail décrit en 1950 par Ephrussi et Slonimski (33) comporte à basse température les bandes α suivantes: $c\alpha$ = 547 mμ, $c_1\alpha$ = 553 mμ, $b\alpha$ = 559-560 mμ et $(a + a_3)\alpha$ = 599-600 mμ.

En 1950, Chaix et Roncoli (76) ont constaté que le spectre de la levure cultivée en aérobiose (souche Gebrüder Mayer) se modifiait en fonction du temps d'incubation de ses cultures en milieu liquide; après 10 heures d'incubation, l'examen spectroscopique révèle dans la zone verte du spectre une large bande s'étendant de 548 mμ à 562 mμ centrée sur 555 mμ et, après 15 à 25 heures d'incubation, les bandes $b\alpha$ et $c\alpha$ nettement distinctes.

En 1956, Ephrussi et coll. (44) ont observé que les bandes d'absorption sont plus faibles en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance

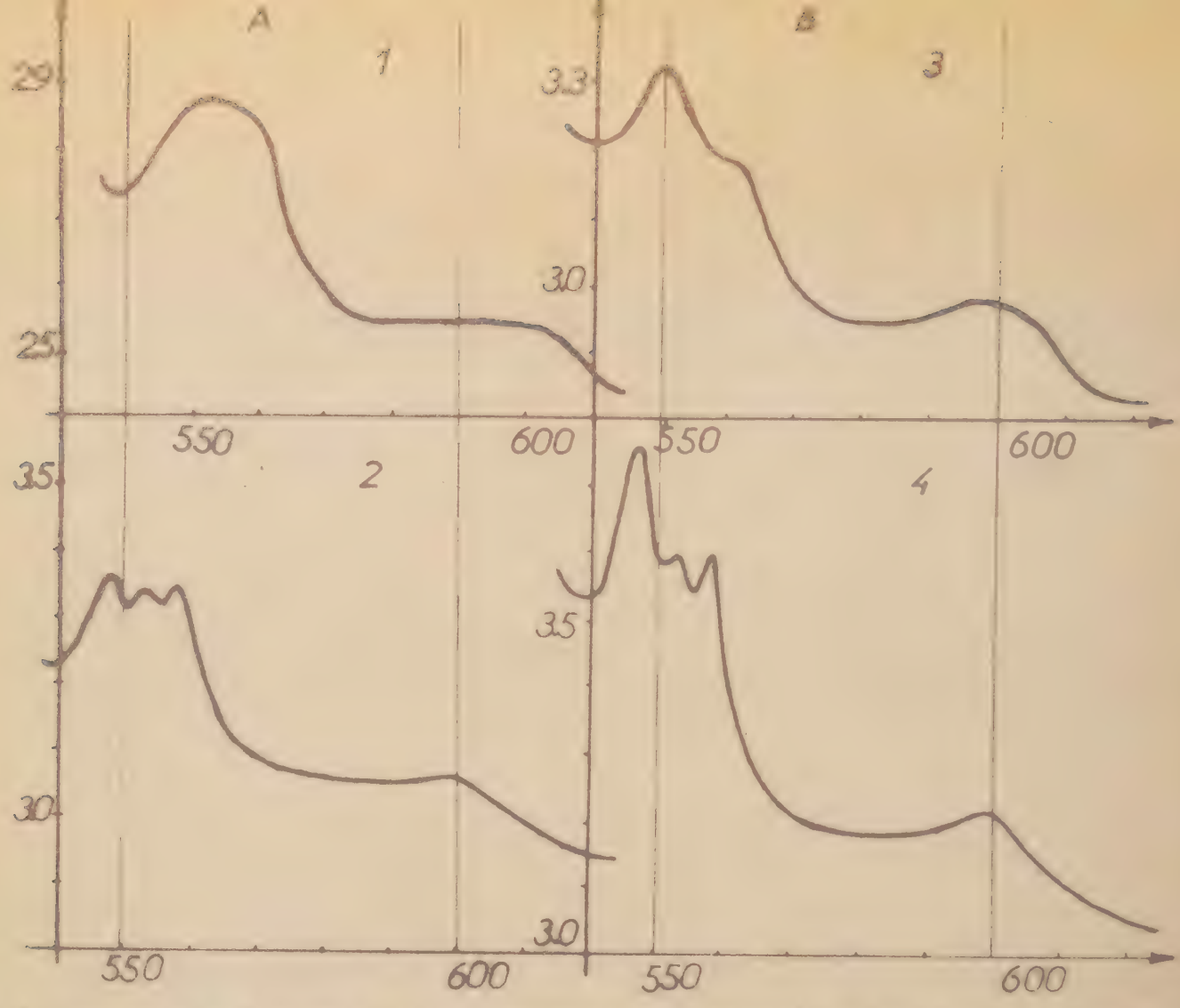


Figure 6: Spectres de la levure cultivée en aérobiose. Réduction par les substrats endogènes.

A : Phase exponentielle de croissance

B : Phase stationnaire de croissance

1) Température ordinaire e = 2,5 mm
2) - 190° e = 1 mm
3) Température ordinaire e = 2 mm
4) - 190° e = 1 mm

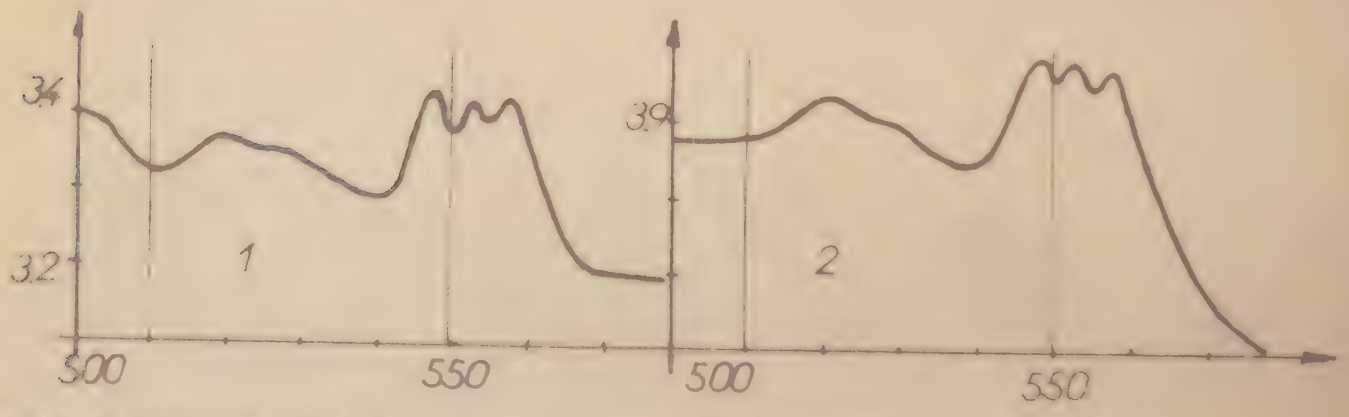


Figure 7: Spectres à -190° de la levure cultivée en aérobiose.

1) Réduction par les substrats endogènes e = 1 mm
2) Réduction par $Na_2S_2O_4$ e = 1 mm

mais que leurs positions sont les mêmes dans les deux cas ainsi que le révèle un examen à la température de l'azote liquide.

Les observations faites par ces différents auteurs nous ayant paru incomplètes, nous avons été conduits à rechercher systématiquement par spectrographie la constitution du spectre hématinique de la souche Yeast Foam cultivée sur milieu liquide à l'extrait de levure et récoltée soit en phase exponentielle, soit en phase stationnaire de croissance (55). Les cultures ont été réalisées dans des "fioles à toxines" de deux litres contenant 200 ml de milieu.

A - Description des spectres cytochromiques.

1- Cas de la phase exponentielle de croissance.

A la température ordinaire nous retrouvons le spectre décrit par Chaix et Roncoli pour des levures récoltées après des temps d'incubation courts. Ce spectre comprend une bande asymétrique vers 555 mμ et une bande aα vers 604 mμ (figure 6, courbe 1).

A la température de l'azote liquide (figure 6, courbe 2), la bande située à 555 mμ à la température ordinaire se scinde en 3 bandes α d'intensité voisine: bα = 558 mμ, $c_1\alpha$ = 553 mμ, cα = 548 mμ; la bande $(a + a_3)\alpha$ est située vers 600 mμ; les bandes β sont peu intenses: on peut toutefois déceler deux sommets vers 519 mμ et vers 530 mμ (figure 7); signalons dès maintenant que les positions des bandes β ont pu être détemminées dans le spectre de fractions subcellulaires dans lequel on distingue : cβ = 519 mμ, $c_1\beta$ = 525 mμ, bβ = 529 mμ, (voir p. 82)

On observe également une faible bande d'absorption située à 503 mμ, décrite par Lindenmayer dans le spectre de levures récoltées au début de la phase stationnaire Comme le signale cet auteur, cette bande disparaît par addition d'hydrosulfite (figure 7).

Notons que, à la température de l'azote liquide, le cytochrome c de levure ne présente qu'une seule bande α à la différence du cytochrome c de muscle cardiaque qui présente 3 bandes α (78).

2- Cas de la phase stationnaire de croissance.

Nous retrouvons les spectres classiques décrits par Keilin et Hartree. A la température ordinaire (figure 6, courbe 3): aα = 600-604 mμ, bα = 560 mμ, cα = 550,5 mμ. A la température de l'azote liquide (figure 6, courbe 4), comme l'ont observé Ephrussi et coll. (44), les positions sont les mêmes qu'en phase exponentielle de croissance. La bande cα est particulièrement intense.

On observe aussi chez les levures en phase stationnaire une bande d'absorption à 503 mμ.

B - Spectre de l'hémochrome de pyridine des pigments de la levure cultivée en aérobiose.

Le spectre de l'hémochrome de pyridine présente à -190°:

1) une bande α située à 548 mμ correspondant à l'hème c, groupement prosthétique du cytochrome c et probablement du cytochrome c_1, ainsi que le suggèrent les résultats récemment obtenus par différents auteurs (79, 80), (à la température ordinaire λ = 551 mμ).

2) une bande α située à 555 mμ correspondant au protohème, groupement prosthétique des cytochromes de type b (à la température ordinaire λ = 557 mμ).

3) une bande α faible située à 585 mμ, correspondant aux hèmes des cytochromes a et a_3 (81) (à la température ordinaire, λ = 587 mμ).

C - Discussion.

Nos observations montrent que les proportions relatives des bandes d'absorption varient suivant les phases de la croissance; en phase exponentielle, la bande cα paraît relativement beaucoup moins intense qu'en phase stationnaire, ce qui explique pourquoi à la température ordinaire les sommets des bandes cα, bα et $c_1\alpha$ se confondent en une bande apparemment unique.

La teneur en cytochrome des levures en phase stationnaire de croissance est plus élevée que celle des levures en phase exponentielle. Il est possible de l'apprécier de la manière suivante:

- les courbes 2 et 4 de la figure 6 correspondent à des préparations de même épaisseur faites à partir de culots de centrifugation de levures obtenus à la même vitesse. Il est donc possible de comparer dans les deux cas pour chaque bande α la différence entre la densité optique au maximum d'absorption et la densité optique à une longueur d'onde de référence à laquelle les cytochromes n'absorbent pas (la valeur de la densité optique de référence ne dépend que des phénomènes de diffusion). Les longueurs d'onde de référence choisies sont 585 mμ et 625 mμ. Les résultats indiqués dans le Tableau VII montrent que l'intensité du spectre des cytochromes c et $(a + a_3)$ d'une part, et celle des cytochromes c_1 et b d'autre part augmente de façon parallèle entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance.

Cytochromes	Absorption maximum mμ	Longueur d'onde de référence: 625 mμ			Longueur d'onde de référence: 585 mμ		
		$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	$\frac{\Delta\varepsilon_2}{\Delta\varepsilon_1}$	$\Delta\varepsilon_1$	$\Delta\varepsilon_2$	$\frac{\Delta\varepsilon_2}{\Delta\varepsilon_1}$
$a + a_3$	600	0,11	0,18	1,64	0,015*	0,035*	2,30
b	558	0,41	0,56	1,36	0,30	0,42	1,40
c_1	552,5	0,40	0,56	1,40	0,29	0,42	1,45
c	548	0,43	0,72	1,67	0,31	0,58	1,87

Tableau VII: Variations de densité optique entre les maxima et les minima des courbes spectrales de la levure en phase exponentielle (figure 6, courbe 2) et en phase stationnaire de croissance (figure 6, courbe 4).

$\Delta\varepsilon$: différence de densité optique entre la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption et la longueur d'onde de référence.

$\Delta\varepsilon_1$: pour la courbe 2, figure 6

$\Delta\varepsilon_2$: pour la courbe 4, figure 6

* ces variations de densité optique sont trop faibles pour être valables étant donné l'imprécision des écrans de référence de densité optique élevée.

Nous avons essayé de déterminer dans le cas de la phase exponentielle et dans le cas de la phase stationnaire de croissance, la concentration en cytochrome c des levures par une méthode utilisée par d'autres auteurs (35, 82). Cette méthode consiste à chauffer les préparations de levure 20 minutes à 80° afin de dénaturer les

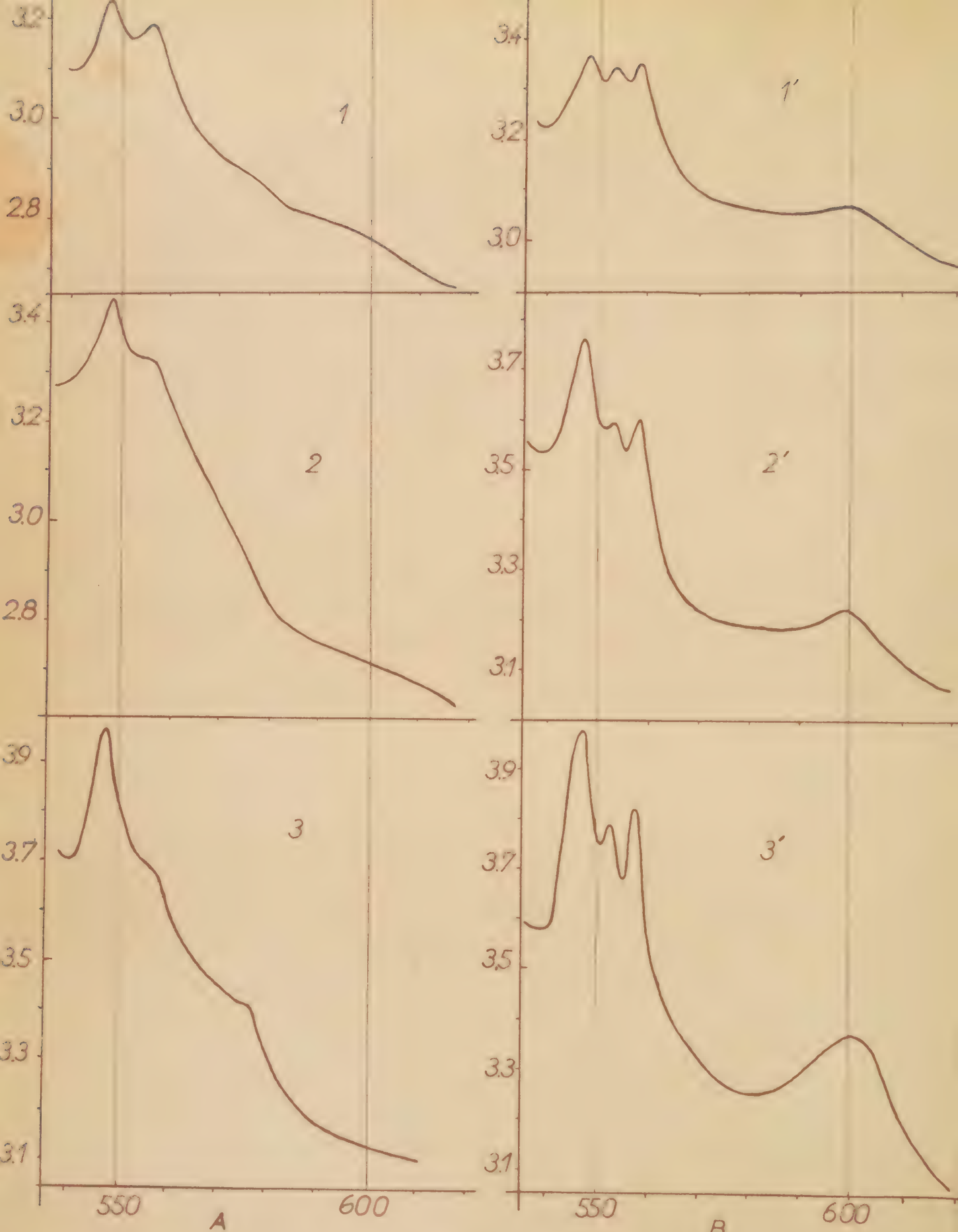

3.2
3.0
2.8
1
3.4
3.2
3.0
1'
3.4
3.2
3.0
2.8
2
3.7
3.5
3.3
3.1
2'
3.9
3.7
3.5
3.3
3.1
3
3.9
3.7
3.5
3.3
3.1
3'
550
A
600
550
B
600

Figure 8

cytochromes autres que le cytochrome c relativement thermostable, et de comparer ensuite l'absorption du cytochrome c in situ avec celle de cytochrome c ajouté en quantité connue à des préparations de levure dépourvues de bandes d'absorption. Malheureusement, cette détermination n'a pas été possible car avec notre souche Yeast Foam, il apparaît une forte bande d'absorption à 556 mμ, dans le spectre des levures chauffées (figure 8, courbes 1 et 2). Dans le cas de la levure de boulangerie commerciale, cette bande apparaît moins nettement car elle est partiellement masquée par la bande cα intense (figure 8, courbe 3).

Figure 8: Spectres à -190° de la levure après chauffage 80° pendant 20 minutes.

A - après chauffage. B - préparations témoin non chauffées.

1 et 1': cellules (Yeast Foam) de phase exponentielle de croissance e = 1 mm.

2 et 2': cellules (Yeast Foam) de phase stationnaire de croissance e = 1 mm.

3 et 3': levure de boulangerie commerciale. e = 1,5 mm.

Nous observons donc, comme Slonimski et coll. (44 , 72) que la teneur en enzymes hématiniques augmente après la phase exponentielle de croissance. Ces auteurs ont montré que la fermentation aérobie du glucose inhibe pendant la phase exponentielle de croissance la synthèse des enzymes respiratoires. Durant la phase de ralentissement, ils observent, parallèlement à l'augmentation de la teneur en enzymes hématiniques, un accroissement de la vitesse de respiration: le Q_{O_2} (µlitres O_2 consommés/h./mg poids sec) égal à 30-40 pendant la phase exponentielle atteint 80 pendant la phase de ralentissement et se maintient à cette valeur élevée pendant la phase stationnaire (au moins 20 h. après la fin de la phase exponentielle); la fermentation aérobie subit une évolution inverse.

Nous observons également durant la phase exponentielle de croissance une faible teneur en enzymes hématiniques (particulièrement en cytochrome c et en cytochrome-oxydase) et une fermentation aérobie élevée. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous n'observons pas la même évolution de l'activité respiratoire. Jusqu'à l'avant-dernière division de la phase exponentielle, le Q_{O_2} est toujours faible (30-34); entre 1 et 2 divisions avant la fin de cette phase, le Q_{O_2} augmente et atteint une valeur moyenne égale à 50 (c'est pendant cette période de la croissance que sont prélevées les levures servant aux expériences de fractionnement - voir IIIème partie). Durant la dernière division de la phase exponentielle, l'activité respiratoire diminue: le Q_{O_2} atteint à nouveau une valeur voisine de 30 et cette valeur se maintient durant la phase stationnaire au moins pendant 22 heures après la fin de la phase exponentielle*. Dans ces conditions, la teneur maxima en cytochrome c et en cytochrome-oxydase ne coïncide pas avec l'activité respiratoire la plus intense. Il est à remarquer:

1) que nos cultures sont ensemencées avec une préculture en phase exponentielle de croissance alors que les cultures effectuées (sur le même milieu) par Slonimski et coll. sont ensemencées avec un inoculum prélevé pendant la phase stationnaire de croissance;
2) que nous n'obtenons jamais, comme Slonimski et coll., une valeur de Q_{O_2} égale à 80. Il ne semble cependant pas à première vue que les faibles valeurs de Q_{O_2} que nous obtenons soient dues à une aération insuffisante de la culture; en effet, les résultats sont les mêmes que les cultures soient effectuées dans des fioles à toxines de 2 l. contenant 200 ml de milieu ou dans des ballons de 6 l. contenant 2 l. de milieu et aérées dans les conditions décrites page 10 .

* Ces expériences ont été suggérées par L. Ohaniance, avec la collaboration de laquelle elles ont été réalisées; des expériences du même genre avaient déjà été effectuées par cet auteur.

II - CAS DE LA LEVURE CULTIVEE EN ANAEROBIOSE.

A la température ordinaire, la levure cultivée en anaérobiose présente, d'après les travaux d'Ephrussi et de Slonimski (33) d'une part et de Lindenmayer et Smith (34) et Lindenmayer (77) d'autre part:

1) une bande située à 557-559 mμ (33) ou à 555 mμ (34)
2) une bande située à 580 mμ (33) ou à 585 mμ (34)
3) une bande située à 530 mμ (77)
4) une bande intense située à 503 mμ disparaissant par addition d'hydrosulfite(77).

A la température de l'air liquide (-170°) d'après Ephrussi et Slonimski, la bande située vers 557-559 mμ à la température ordinaire reste unique et se déplace à 554 mμ.

L'étude spectrographique systématique que nous avons faite à basse température nous a permis de mettre en évidence la variabilité du spectre hématinique au cours de la croissance anaérobie de la levure et de comprendre ainsi pourquoi les résultats des différents auteurs ne concordaient pas exactement.

L'évolution du spectre a été suivie de la phase exponentielle à la phase stationnaire dans le cas de cultures réalisées soit sur un milieu complexe à l'extrait de levure, soit sur un milieu synthétique (83).

A - Description de l'évolution du spectre des levures.

1 - Cultures sur milieu à base d'extrait de levure:

Les cultures sont effectuées dans un ballon de 750 ml contenant 400 ml de milieu. La courbe de croissance est donnée figure 9. Le taux de croissance est de 0,65. Après une phase exponentielle relativement courte, la vitesse de la croissance diminue très lentement avant que soit atteinte la phase stationnaire. Ces conditions sont excellentes pour observer les différents stades de l'évolution du spectre hématinique,car il est possible d'effectuer plusieurs récoltes dans l'intervalle de temps où la vitesse de multiplication commence à diminuer.

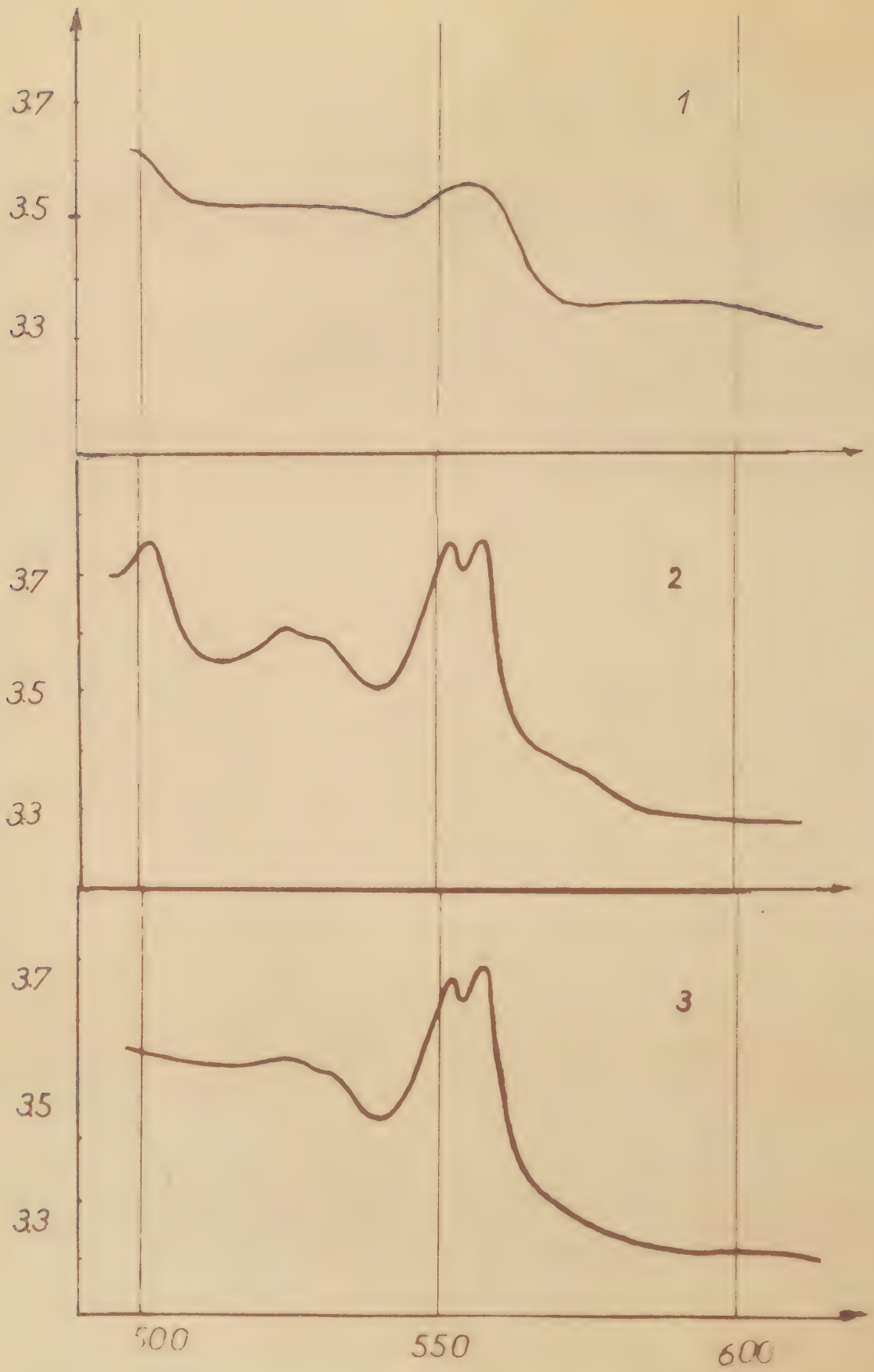


Figure 10: Spectre de la levure récoltée en phase exponentielle de croissance anaérobie.

1) Température ordinaire, réduction par les substrats endogènes, e = 3 mm
2) - 190° " " e = 1,5 mm
3) - 190° " par $Na_2S_2O_4$ e = 1,5 mm

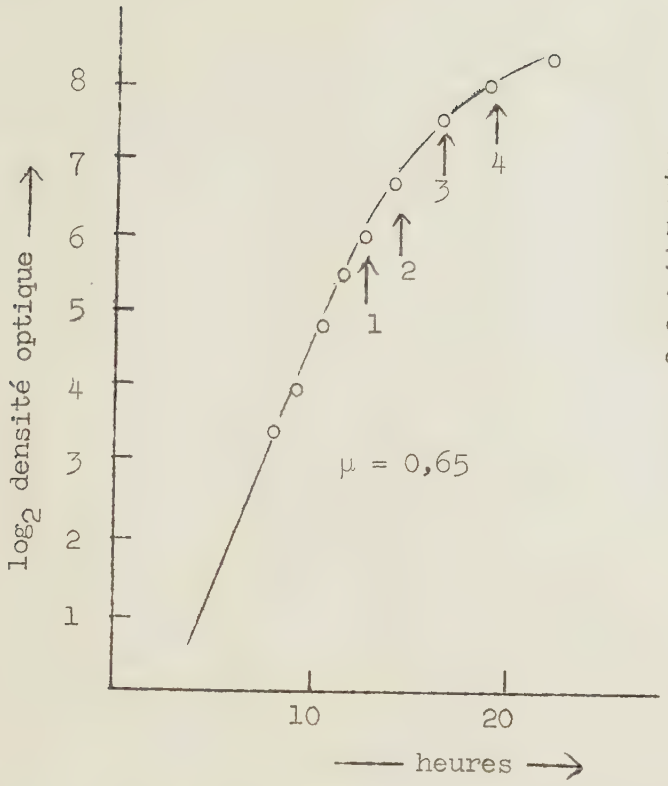


Figure 9: Courbe de croissance de la levure cultivée en anaérobiose sur milieu à l'extrait de levure.
Les flèches indiquent les densités optiques de récolte des cultures effectuées en vue d'étudier l'évolution des spectres:

1- 64 U.C.
2- 102 U.C.
3- 120 U.C.
4- 178 U.C.

a) Spectre des levures récoltées en phase exponentielle de croissance:

A la température ordinaire, le spectre présente une bande α assez large vers 557 mμ (figure 10, courbe 1). L'agitation en présence d'oxygène d'une suspension de cellules de levure dans le tampon phosphate 0,067 M, pH 4,6 ne provoque pas la disparition de cette bande d'absorption.

A la température de l'azote liquide, il présente trois bandes α (55) situées respectivement à 552,5 mμ, 558 mμ et vers 575 mμ (figure 10, courbe 2). Les deux premières bandes sont très nettes et distinctes *. A basse température, deux bandes β peuvent être distinguées à 525 mμ et à 532,5 mμ. On observe également à la température ordinaire et à la température de l'azote liquide la bande située à 503 mμ décrite par Lindenmayer (77). Par addition d'hydrosulfite, les bandes situées à 503 mμ et à 574,5 mμ disparaissent (figure 10, courbe 3).

* Le dédoublement à la température de l'azote liquide de la bande située à la température ordinaire à 557 mμ, a été décrit peu de temps après nous par Lindenmayer et Estabrook (30).

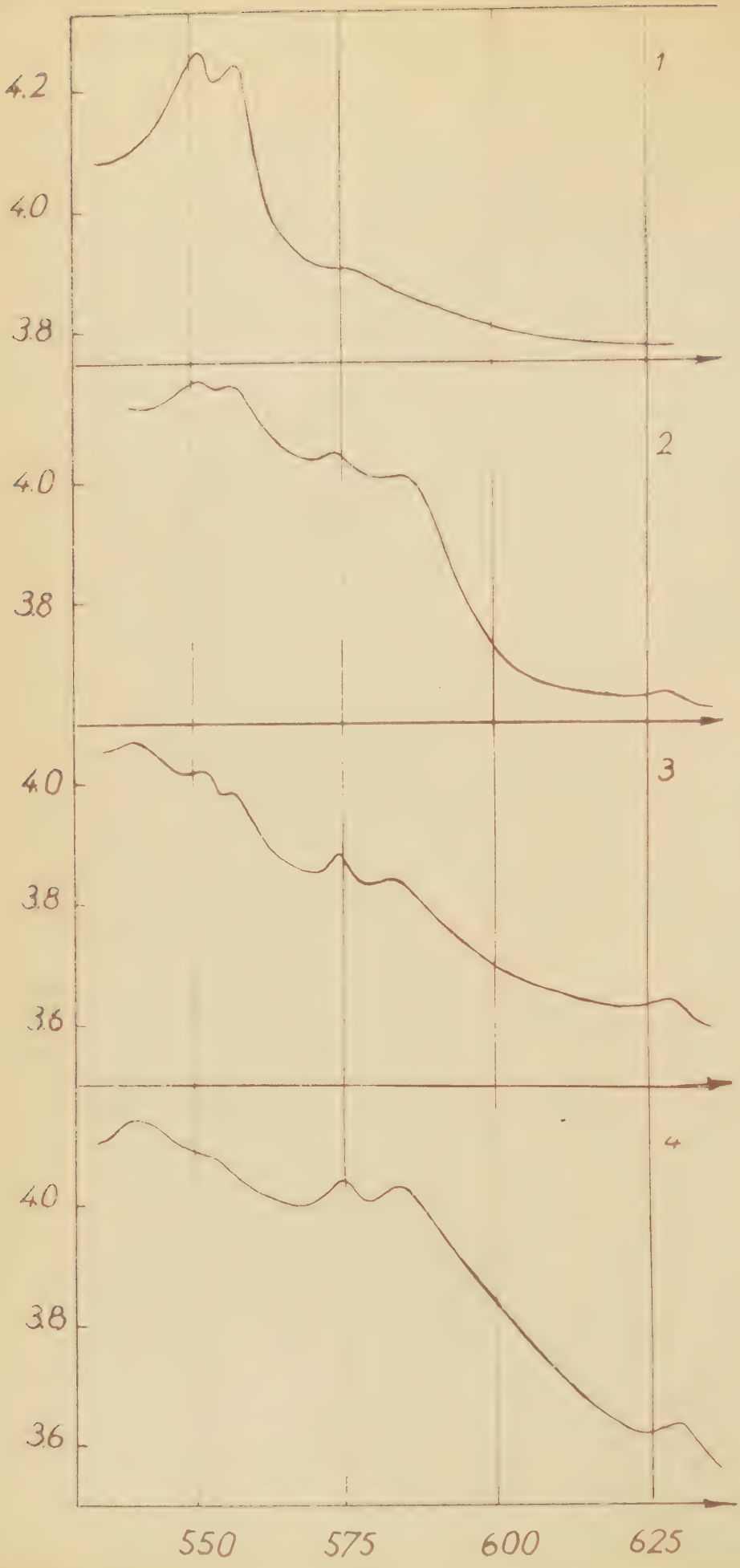


Figure 11: Evolution d. spec
de la levure cultivée en ana
lose en fonction des phases
croissance.
réduction par les substrats
endogènes.
ensité optique de la cultu
au moment de la récolte:

1) 64 U.C.
2) 102 U.C.
3) 120 U.C.
4) 178 U.C.

b) Spectre de levures récoltées pendant la phase de ralentissement de la croissance:

1) quand la densité optique de la culture atteint 102 U.C., on observe à la température ordinaire deux larges bandes situées vers 557 mμ et vers 580 mμ. A la température de l'azote liquide (figure 11, courbe 2), la bande à 557 mμ se scinde là encore très nettement en deux bandes situées comme au stade précédent à 552,5 mμ et à 558 mμ. De plus, la bande à 580 mμ se scinde en deux bandes situées à 574,5 mμ et à 583,5 mμ. La position du sommet de cette dernière bande, large et mal définie dans les cellules entières, a pu être déterminée avec précision par spectrographie d'une fraction subcellulaire (cf. p.54) dans laquelle est concentré le pigment correspondant à cette bande (figure 12). L'intensité de cette bande à 583,5 mμ varie beaucoup suivant les conditions de culture, en particulier suivant l'agitation du milieu et le rapport volume de la culture/volume du récipient de culture. Cette bande est vraisemblablement la même que celle observée à 585 mμ par Lindenmayer et Smith (34).

A ce stade de la croissance, la bande située à 574,5 mμ a une intensité relative plus grande qu'au stade précédent. Enfin, il apparaît une bande, assez faible, vers 630 mμ.

En résumé, pour une phase de croissance intermédiaire entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, le spectre à la température de l'azote liquide présente 5 bandes α : 552,5 mμ, 558 mμ, 574,5 mμ, 583,5 mμ, 630 mμ.

2) quand la densité optique de la culture atteint 120 U.C., l'importance relative des différentes bandes a encore évolué. A la température de l'azote liquide (figure 11, courbe 3), on observe un affaiblissement des bandes 552,5 mμ et 558 mμ; l'accentuation des autres bandes et l'apparition d'une nouvelle bande très large vers 540 mμ.

3) quand la densité optique de la culture atteint 178 U.C., (figure 11, courbe 4), on observe, à la température de l'azote liquide, la disparition presque complète des bandes situées à 552,5 mμ et à 558 mμ qui semblent se confondre maintenant en une bande très faible située vers 555 mμ. Les trois autres bandes: 574,5 mμ, 583,5 mμ et 630 mμ se sont encore accentuées. Les bandes β situées vers 520-530 mμ sont peu nettes.

A tous les stades de la croissance anaérobie, la bande située à 503 mμ décrite par Lindenmayer est présente. Elle est toutefois beaucoup plus nette en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance.

Le spectre correspondant à la densité optique de 158 U.C. est déjà le même que celui que l'on observera durant toute la phase stationnaire de croissance à ceci près que la bande située à 555 mμ peut disparaître complètement (en l'absence d'hydrosulfite).

L'addition d'hydrosulfite de Na à la concentration finale de 10^{-3} M provoque la disparition des bandes situées à 503 mμ et 574,5 mμ et l'atténuation de la bande située à 540 mμ. Elle provoque également l'intensification de la bande située à 555 mμ chez les levures récoltées pendant la phase de ralentissement et la faible réapparition de cette bande chez les levures en phase stationnaire.

2- Cultures sur milieu synthétique:

L'étude spectrale à basse température montre que le spectre de la phase exponentielle est le même que celui de la levure cultivée sur milieu à l'extrait de levure. Mais comme sur milieu synthétique, la phase de ralentissement de la croissance est beaucoup plus courte, il est difficile d'effectuer plusieurs récoltes en vue d'observer l'évolution du spectre. Le spectre de la levure en phase stationnaire indique que les cellules qui se sont multipliées sur milieu synthétique possèdent les mêmes pigments mais en moindre abondance (pour une préparation de même épaisseur, l'intensité des bandes d'absorption est plus faible) que celles cultivées sur un milieu à l'extrait de levure.

B - Influence de différents facteurs sur l'évolution du spectre.

Nous avons recherché si un certain nombre de facteurs exerçaient une influence sur l'évolution du spectre hématinique des levures cultivées en anaérobiose; dans ce but, nous avons fait varier le nombre de repiquages en anaérobiose des précultures, le rendement de la culture à la fin de la phase exponentielle, le taux de croissance, le pH d'incubation, l'atmosphère des cultures. Enfin, nous avons vérifié que les modifications spectrales ne correspondent pas à une éventuelle contamination

par l'oxygène au cours des récoltes.

1- Influence du nombre de repiquages anaérobies des précultures.

La même évolution spectrale est retrouvée dans une culture ensemencée avec un inoculum provenant d'une culture issue de 5 repiquages en anaérobiose stricte. Les spectres décrits correspondent donc bien à des levures tout à fait adaptées à l'anaérobiose.

2- Influence du rendement à la fin de la phase exponentielle de croissance:

Il nous a été possible de modifier la durée d'une croissance exponentielle s'effectuant avec un taux de croissance égal à 0,5 en modifiant soit la composition du milieu synthétique, soit les conditions de culture.

a) si, la concentration en Tween 80 étant de 0,016 % et celle en ergostérol étant de 0,002 %, on fait varier la concentration de $SO_4(NH_4)_2$ entre 0,05 % et 0,4 %, la densité optique atteinte à la fin de la phase exponentielle varie entre 50 U.C. et 124 U.C.

b) si, la concentration du $(NH_4)_2SO_4$ étant de 0,4 %, on augmente le concentration du Tween 80 à 0,112 % et celle de l'ergostérol à 0,016 %, la densité optique à la fin de la phase exponentielle atteint dans ce cas 188 U.C.

c) si, le milieu ayant la composition donnée au paragraphe précédent, la culture est effectuée non plus dans un ballon de 750 ml contenant 400 ml de milieu, mais dans un ballon de 6 litres contenant 600 ml de milieu, dans ce cas, la phase exponentielle se prolonge et la densité optique atteint 230 U.C.

Dans ces différentes conditions, nous avons effectué des examens spectrographiques sur les levures récoltées en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire de croissance et nous avons observé, quelle que soit la durée de la phase exponentielle, le même spectre hématinique. Autrement dit, la constitution du spectre est caractéristique de la phase de croissance.

3- Influence du taux de croissance:

Il nous a été possible de faire varier le taux de croissance soit en abaissant la température d'incubation, soit en modifiant la composition du milieu.

a) le taux de croissance d'une culture sur milieu à l'extrait de levure, incubée à 12° est de 0,05. Pendant sa phase exponentielle (récolte effectuée à 23 U.C. après 60 heures d'incubation) elle présente à -190° un spectre à trois bandes α: 552,5 mμ, 558 mμ, 574,5 mμ. Pendant sa phase stationnaire (récolte effectuée après 90 heures d'incubation) elle présente un spectre à -190° dans lequel on peut distinguer une bande faible à 555 mμ, une bande vers 580 mμ correspondant à la fusion des bandes à 574,5 mμ et 583,5 mμ et deux bandes très nettes à 540 mμ et 630 mμ.

b) le taux de croissance sur le milieu "Basal n°2" d'Andreasen et Stier (7-II) mais ne contenant pas d'ergostérol est de 0,11. L'évolution est la même que précédemment; une récolte effectuée à la densité optique de 9,5 U.C. (phase exponentielle) présente le spectre 1 de la figure 11. Une récolte effectuée à la densité optique de 17 U.C. (phase de ralentissement) présente le spectre 3 de la figure 11. Une récolte effectuée à la densité optique de 25 U.C. (phase stationnaire) présente le spectre 4 de la figure 11.

Le spectre de la phase exponentielle reste donc le même quel que soit le taux de croissance entre $\mu = 0,05$ et $\mu = 0,65$ (taux de croissance sur milieu à l'extrait de levure).

4- Influence du pH:

Nous avons vu que le pH d'une culture effectuée sur le milieu synthétique nous ayant donné la meilleure croissance passe de 4,9 en phase exponentielle à 4,65 en phase de ralentissement, puis à 4,4 en phase stationnaire de croissance. En ajustant initialement le pH du milieu à 4,4 nous avons constaté que le taux de croissance était le même avec une phase exponentielle plus courte. Dans ces conditions, le pH passe à 4,1 en phase de ralentissement, puis à 3,7 en phase stationnaire, mais l'évolution spectrale reste la même. Le pH ne semble donc pas intervenir dans les changements observés.

5- Influence du CO_2:

Nous avons voulu voir si l'accumulation de CO_2 au fur et à mesure que la croissance progresse n'influençait pas l'évolution du spectre. Une élimination du CO_2

par passage d'azote dans le milieu de culture au cours de l'incubation ne retarde pas l'évolution du spectre. D'autre part, une culture sur milieu à l'extrait de levure, effectuée en atmosphère de CO_2, présente la même évolution spectrale qu'une culture effectuée en atmosphère d'azote.

6- Influence des conditions de récolte:

Pour vérifier que les deux bandes situées à 552,5 mμ et à 558 mμ que nous observons en phase exponentielle de croissance ne correspondent pas à une éventuelle induction par l'oxygène (capable de provoquer l'apparition des cytochromes b et c_1 dont les bandes α sont situées à peu près aux mêmes longueurs d'onde) au cours de la récolte, nous avons réalisé l'expérience suivante: le récipient de culture est muni latéralement d'une cuve à faces parallèles (diamètre intérieur = 8 mm) en plexiglas. Cette cuve est adaptée au ballon après stérilisation à l'aide d'un petit tuyau en caoutchouc à vide. Après des temps d'incubation convenablement choisis, on immobilise le ballon dans une position telle que les levures décantent dans cette cuve qui peut être ensuite détachée du ballon et plongée dans l'azote liquide pour l'examen spectroscopique. Le spectre observé dans ces conditions, à -190°, est identique à celui des levures récoltées à partir de prélèvements.

C - Spectre des hémochromes de pyridine des pigments de levures cultivées en anaérobiose.

1- Cas des levures de phase exponentielle de croissance:

Le spectre de l'hémochrome de pyridine présente à -190° une seule bande α symétrique située à 555 mμ et une bande β située à 532,5 mμ. Le spectre est le même que celui de l'hémochrome de pyridine du protohème.

2- Cas des levures de phase stationnaire de croissance:

Le spectre de l'hémochrome de pyridine présente toujours une bande α intense située à 555 mμ et parfois une deuxième bande α située à 590 mμ. La présence de cette bande semble dépendre de l'intensité de la bande située à 583,5 mμ dans le spectre des levures de phase stationnaire.

D - Discussion.

Ainsi, au cours des différentes phases de la levure cultivée en anaérobiose apparaissent, dans un ordre bien défini, une série de composantes hématiniques. La question se pose de savoir s'il est possible de les assimiler à des hémoprotéines déjà connues.

Nous allons envisager successivement le cas de chacune des bandes d'absorption observées:

1- Bandes d'absorption à 503 mμ:

L'existence de cette bande a été mentionnée pour la première fois par Lindenmayer (77) qui constate, comme nous l'avons fait également, qu'elle disparaît en présence d'hydrosulfite et de cyanure. Il suppose qu'elle ne correspond ni à un composé de nature cytochromique, ni à un composé de nature flavinique, et que le pigment dont elle dépend ne participerait pas directement aux processus d'oxydo-réduction. Aucun résultat susceptible de vérifier ces hypothèses n'a encore été fourni.

Il est à noter que le spectre de la cytochrome-c-peroxydase, extraite par Abrams et coll. (32) de la levure cultivée en aérobiose, présente en particulier des bandes d'absorption situées à 500 mμ et à 620 mμ. L'hydrosulfite provoque la disparition de ces bandes et l'apparition d'une bande située à 560 mμ. D'après Chantrenne (84) la cytochrome-c-peroxydase, dosée en présence d'H_2O_2, selon la méthode d'Abrams et coll.,n'existe qu'à l'état de traces dans les levures cultivées en anaérobiose et apparaît au cours de l'aération de cette levure dans un tampon glucosé. Smith (85) au contraire, par dosage en présence de méthyle peroxyde selon la méthode décrite par Chance (86), trouve chez la levure cultivée en anaérobiose, une activité cytochrome-c-peroxydase qui n'augmente pas de façon appréciable par aération de cette levure pendant 5 heures dans du tampon glucosé. Toutefois, les bandes que nous avons observées à 630 mμ et à 503 mμ dans le spectre de la levure en phase stationnaire de croissance anaérobie, ne semblent pas correspondre à cet enzyme car l'hydrosulfite ne provoque dans ce spectre ni la disparition de la bande à 630 mμ, ni l'apparition d'une bande à 560 mμ.

2- Bandes d'absorption à 574,5 mμ:

La question se pose de savoir si cette bande correspond à la présence d'hémoglobine puisqu'elle disparaît par addition d'hydrosulfite. Keilin (87) signale l'existence d'hémoglobine dans la levure. Il observe que la forte aération d'une suspension de levure provenant d'une culture aérobie provoque l'apparition d'une bande située (à la température ordinaire) à 583 mμ. Cette longueur d'onde ne correspont cependant pas aux positions des bandes d'absorption de l'oxyhémoglobine données par différents auteurs (88, 89) et qui, à la température ordinaire, sont les suivantes: 540-542 mμ et 576-578 mμ.

Comme les basses températures ont pour effet de déplacer les bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde, il est possible que chez les levures cultivées en anaérobiose, les bandes situées à 574,5 mμ * et à 540 mμ, à la température de l'azote liquide, correspondent à de l'oxyhémoglobine. La bande située à 574,5 mμ étant peu intense en phase exponentielle de croissance, il est possible qu'on ne puisse distinguer la bande à 540 mμ qui l'accompagne. Comme la large bande observée vers 540 mμ en phase stationnaire s'atténue sans disparaître en présence d'hydrosulfite 10^{-3}M, il est possible qu'elle corresponde à la fusion d'une des bandes de l'oxyhémoglobine et de la bande λ = 540 mμ accompagnant par exemple la bande située à 583,5 mμ.

A première vue, la présence d'oxyhémoglobine chez la levure cultivée en anaérobiose peut paraître surprenante. Il n'est pas à exclure, toutefois, que la dégradation anaérobie de certains substrats fournisse une faible quantité d'oxygène. Nous avons vu que L. Smith (85) trouve chez les levures anaérobies une activité peroxydasique, d'où la possibilité d'une source d'oxygène. Si elle existe, cette quantité d'oxygène doit toutefois être inférieure à la pression partielle d'oxygène nécessaire à l'induction des enzymes respiratoires. D'après Terui et coll. (90) cette induction nécessite une concentration d'oxygène dans le milieu supérieure à 10^{-5}M, (l'adaptation a été déterminée dans ce cas par des mesures de vitesse de respiration).

---

* L'observation de cette bande à la température ordinaire est difficile car en phase exponentielle de croissance, elle est trop faible pour être décelée et en phase stationnaire, il y a interférence entre cette bande et la bande située à 583,5 mμ.

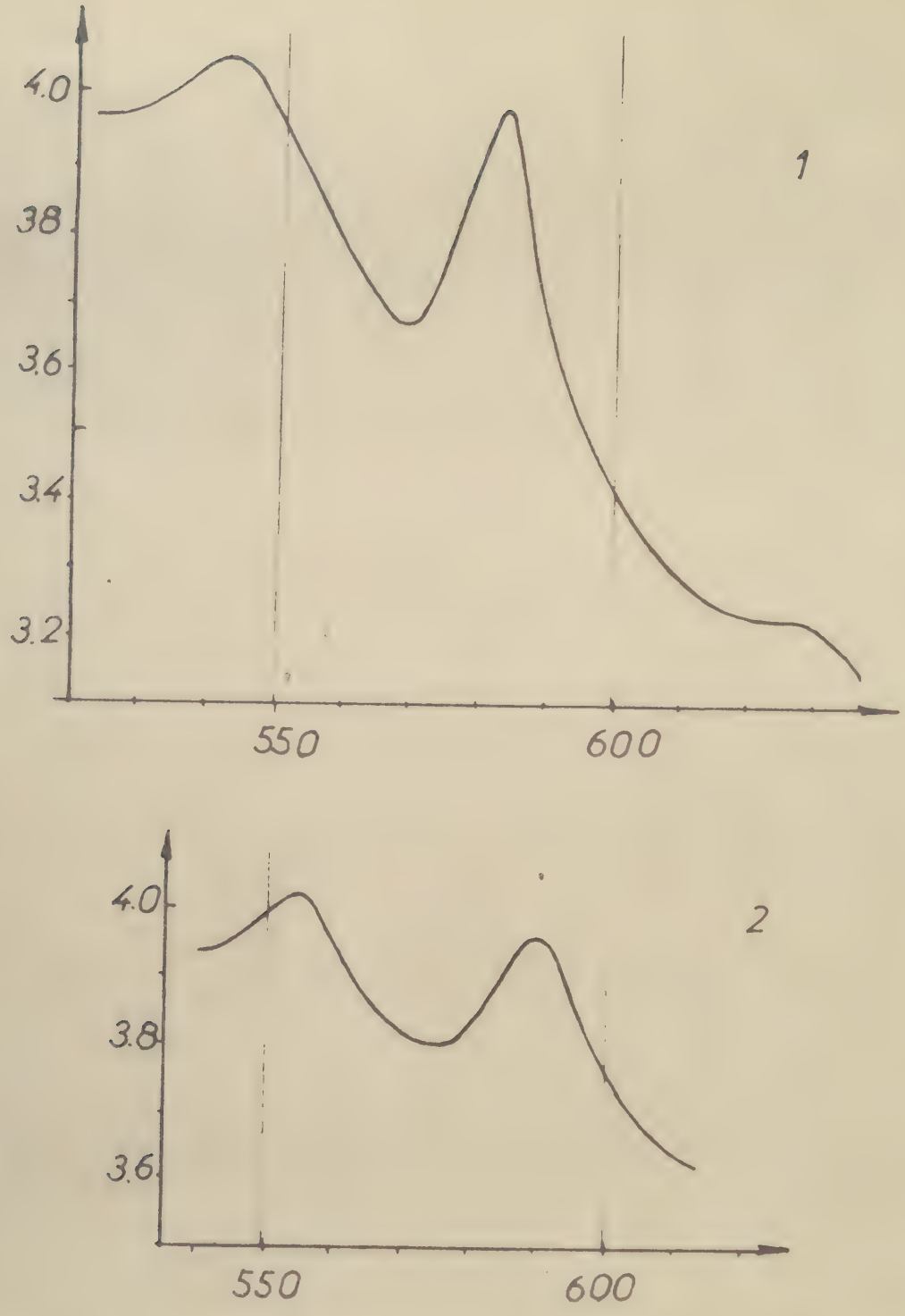


Figure 12: Spectre à -190° d'une fraction particulaire de levure récoltée en phase stationnaire de croissance anaérobie.

Les cellules de levure de la culture récoltées à 276 U.C. ont été lavées par centrifugation dans l'eau, puis remises en suspension dans le lactose 0,5 M et ensuite broyées pendant 40 secondes à l'aide du Zell Homogenizator. La fraction particulaire a été obtenue par une centrifugation de 90 minutes à 105.000 g de l'homogénat.

1) Spectre réduit par $Na_2S_2O_4$ e = 1 mm
2) Hémochrome de pyridine e = 0,8 mm

3- Bandes d'absorption à 583,5 et à 540 mμ:

La bande d'absorption située à 583,5 mμ occupe la même position que la bande α du cytochrome a_1 décrit en particulier chez Acetobacter pasteurianum (91) et chez Escherischia coli(92). Ce cytochrome a été classé dans le groupe des cytochromes de type a, car les microorganismes traités par la pyridine donnent un hémochrome de type a dont la bande α est située à 580-590 mμ. Or les levures de phase stationnaire anaérobie dont le spectre possède une bande intense à 583,5 mμ présentent, après traitement par la pyridine en milieu alcalin, un spectre d'hémochrome de type a (α = 589 mμ) *.

Le fait que cet hémochrome de pyridine correspond bien à celui du pigment absorbant à 583,5 mμ est prouvé par l'expérience suivante: on fractionne le contenu cellulaire de levure en phase stationnaire de croissance anaérobie (dans les conditions précisées dans la légende de la figure 12); on obtient une fraction dont le spectre (à -190°) est caractérisé par une bande à 542 mμ, une bande intense à 583,5 mμ et une bande à peine perceptible à 630 mμ. L'hémochrome de pyridine de cette fraction est caractérisé (à -190°) par une bande vers 590 mμ et une bande plus faible à 555 mμ. Il est évident que la première correspond à l'hémochrome du pigment absorbant à 583,5 mμ; la seconde correspond à l'hémochrome du protohème libre ou fourni par les pigments absorbant soit à 542 mμ, soit à 630 mμ, soit à ces deux longueurs d'onde. Le fait que le spectre de cette fraction particulaire comporte une bande à 542 mμ suggère que celle-ci est la bande β associée à la bande α absorbant à 583,5 mμ. Mais il est également possible que la bande située à 542 mμ corresponde à un autre pigment. Notons à ce sujet que le spectre de la fraction particulaire présente une bande très étroite dont le sommet peut être situé avec précision à 542 mμ. Ceci indique encore que l'absorption vers 540 mμ correspond à la superposition de deux bandes.

4- Bande d'absorption à 630 mμ:

Nous n'avons pu jusqu'ici assimiler cette bande à une composante connue.

a) Nous avons envisagé l'hypothèse que la bande à 630 mμ dépend d'une porphyrine libre; cependant le pigment correspondant à cette bande n'a pu être extrait par les procédés classiques d'extraction de porphyrine (57). Nous avons opéré de la manière suivante: les levures de phase stationnaire anaérobie ont été récoltées

* Barrett (93) récemment, a isolé de l'hématine a à partir de la levure (Yeast Foam) cultivée en anaérobiose.

par centrifugation, remises en suspension dans un tampon phosphate 0,02 M, pH 7,3, et broyées pendant 45 secondes à l'aide du "Zell Homogenisator". Les gros débris ont été éliminés par une centrifugation de 20 minutes à 1.000 g et l'homogénat particulaire obtenu après une centrifugation de 90 minutes à 10.500 g présente le même spectre que les cellules entières. Son extraction par le chloroforme ou par l'acide acétique glacial, puis l'éther ne permet pas la séparation de pigments.

Bien que cet essai ait échoué, il est possible que certains pigments des levures en phase stationnaire de croissance anaérobie correspondent à des porphyrines. Un argument en faveur de cette hypothèse est fourni par les résultats de Slonimski (35) qui mettent en évidence une excrétion de porphyrines dans le milieu de culture, excrétion particulièrement intense en anaérobiose, augmentant au cours de l'incubation.

b) Nous avons envisagé la possibilité que la bande d'absorption située à 630 mμ dépende de la présence de catalase dont le spectre, à la température ordinaire, est le suivant; 629-622 mμ, 544-536 mμ, 506-520 mμ. Nous avons recherché l'activité catalasique, par la méthode de Fugita et Kodama (94), de la levure cultivée en aérobiose et en anaérobiose et récoltée en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Nous avons observé que cette activité est environ 100 fois plus forte chez les levures cultivées en aérobiose que chez les levures cultivées en anaérobiose, et dans ce deuxième cas, elle est plus faible en phase stationnaire de croissance qu'en phase exponentielle. Or, c'est en phase stationnaire de croissance que le spectre de la levure présente les bandes d'absorption à 630 mμ et à 540 mμ. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chantrenne et Courtois (95) d'après lesquels la levure cultivée en anaérobiose contient très peu de catalase. Cet enzyme apparaît par aération des levures dans un milieu glucosé.

c) La bande d'absorption à 630 mμ ne peut correspondre non plus au cytochrome a_2 absorbant à 628-632 mμ observé chez un certain nombre de microorganismes (81). Ce cytochrome donne avec la pyridine un hémochrome absorbant à 625 mμ, et à 600-605 mμ ce qui n'est pas le cas chez la levure cultivée en anaérobiose. De plus, la synthèse de ce cytochrome nécessite, d'après Moss, chez Aerobacter aerogenes, la présence d'oxygène (96).

5- Bandes d'absorption à 552,5 mμ et à 558 mμ:

Le ou les composés hématiniques correspondant aux bandes d'absorption α situées à 552,5 mμ et à 558 mμ et β situées à 525 mμ et à 532,5 mμ sont désignés au cours de cet exposé, par le terme de cytochrome b_1, terme proposé par les auteurs (33) qui ont observé ce pigment pour la première fois à température ordinaire. Notons toutefois que ce terme prête à certaines confusions. Il a été en effet utilisé dans le cas de plusieurs microorganismes (97) pour désigner une bande absorbant aux environs de 555 mμ à la température ordinaire. L'étude spectroscopique de quelques-uns de ces microorganismes a ensuite été faite à basse température et a révélé que cette bande $b_1\alpha$ est susceptible de se scinder en plusieurs bandes (54, 92) pouvant même comprendre la bande cα (c'est le cas de la levure de brasserie (98, 99)). Dans le cas de la levure de boulangerie cultivée en anaérobiose, il est possible que les deux bandes α et les deux bandes β qui apparaissent à -190°, correspondent à un seul pigment; en effet, l'abaissement de la température fait apparaître plusieurs bandes dans le spectre de certains cytochromes obtenus à l'état purifié ou cristallisé: c'est le cas du cytochrome c cristallisé de mammifères (78), du cytochrome b_2 purifié de levure (30), du cytochrome h purifié de l'hépatopancréas d'Helix pomatia (100).

Nous avons établi grâce à de très nombreuses expériences, que ces deux bandes sont caractéristiques de la phase exponentielle de croissance quelle que soit la vitesse de la multiplication cellulaire. Aussitôt que celle-ci se ralentit, que ce ralentissement soit dû à un appauvrissement du milieu, à une variation du pH ou à une accumulation de substances toxiques, ces bandes s'atténuent, puis disparaissent presque complètement.

Lindenmayer et Estabrook (30) disent avoir observé ces deux bandes, avec une souche différente de la nôtre, aussi bien en phase exponentielle, qu'en phase stationnaire de croissance anaérobie. Mais ces auteurs ne donnent ni la courbe de croissance de la culture, ni la densité cellulaire de l'inoculum utilisé, ni le mode de culture (aérobie ou anaérobie) de la préculture. Ils indiquent seulement que la densité optique de leur culture effectuée sur un milieu complexe à l'extrait de levure, additionné de Tween 80 et d'ergostérol, double en deux heures30 et que la récolte est effectuée après 14 heures ou 24 heures d'incubation. Il paraît surprenant, le taux de croissance étant faible, que 24 heures d'incubation sur un milieu complexe soient suffisantes pour atteindre la phase stationnaire de croissance, sauf si

l'utilisation d'un inoculum massif raccourcit la phase de latence ou même la phase exponentielle de croissance de la culture (44).

Le fait que Lindenmayer et Estabrook obtiennent des résultats différents des nôtres dépend probablement soit de ce que ces auteurs utilisent une souche différente de la nôtre, soit plutôt que ce que les spectres observés pour les levures d'une culture maintenue en incubation pendant 24 heures ne correspondent pas à la phase stationnaire de croissance de cette culture.

En ce qui concerne la fonction du cytochrome b_1 et son assimilation à des composantes connues, les hypothèses suivantes peuvent être envisagées:

a) le cytochrome b_1 correspondrait aux cytochromes c_1 et b dont les bandes d'absorption α sont situées aux mêmes longueurs d'onde. Le cytochrome c_1 n'est également décelable que par spectrographie à basse température. Cependant, le cytochrome c_1 semble posséder le même groupement prosthétique que le cytochrome c et nous avons vu que celui-ci donne avec la pyridine une bande d'absorption située à 548 mμ à la température de l'azote liquide, alors que le cytochrome b_1 donne avec la pyridine la bande caractéristique du protohème; cette bande est symétrique et ne correspond donc qu'à un seul groupement prosthétique.

b) le cytochrome b_1 correspondrait au cytochrome b_2 dont le spectre à basse température est le même. Cette hypothèse a également été formulée par Lindenmayer et Estabrook. Les raisons pour lesquelles elle ne peut être retenue à l'heure actuelle seront exposées dans le Chapitre II de la troisième partie de cet exposé.

c) le cytochrome b_1 aurait une fonction propre et participerait à des réactions d'oxydo-réduction anaérobies. Une telle fonction ne serait d'ailleurs pas forcément incompatible avec le rôle de précurseur des cytochromes de la chaîne respiratoire classique. Les réactions d'oxydo-réduction auxquelles participe le cytochrome b_1 seront envisagées au cours du chapitre II de la troisième partie. L'hypothèse d'après laquelle les pigments observés en anaérobiose seraient des précurseurs des pigments aérobies sera discutée au chapitre suivant.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

L'étude à basse température du spectre hématinique de la levure cultivée en aérobiose, en fonction de ses phases de croissance, révèle:

1) des variations dans les proportions relatives des différents cytochromes ($a + a_3$), b, c_1 et c se traduisant par une intensification de la bande $c\alpha$ au cours de la phase stationnaire;

2) une teneur en pigments plus élevée chez les levures de la phase stationnaire que chez les levures de phase exponentielle, ainsi que l'avaient déjà observé Ephrussi et coll. par examen spectroscopique.

Dans le cas de la levure cultivée en anaérobiose, le spectre d'absorption change radicalement au cours de la croissance. Cette évolution se traduit par la disparition des bandes du cytochrome b_1 (α = 552,5 et α = 558 mμ à -190°) au cours de la phase de ralentissement de croissance par l'apparition progressive au cours de cette même phase de bandes d'absorption situées à 540 mμ et à 583,5 mμ, et 630 mμ, et par une intensification de la bande située à 574,5 mμ. Il a été vérifié que cette évolution est indépendante du nombre de repiquages en anaérobiose, de la durée de la phase exponentielle de croissance, du taux de croissance, du pH du milieu de culture, ou d'une éventuelle intervention de l'oxygène au cours de la récolte.

Le cytochrome b_1 caractéristique de la phase exponentielle de croissance présente à -190° deux bandes α situées à 552,5 mμ et à 558 mμ, et deux bandes β situées à 525 mμ et à 532,5 mμ. Son groupement prosthétique correspond au protohème d'après le spectre de l'hémochrome de pyridine. Dans nos conditions expérimentales le cytochrome b_1 n'est pas autoxydable.

A propos des spectres observés chez la levure récoltée en phase stationnaire de croissance anaérobie, nous pouvons faire les remarques suivantes:

1) la bande observée à 574,5 mμ chez les levures en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance anaérobie correspond peut-être à de l'oxyhémoglobine.

2) la bande observée à 583,5 mμ chez les levures en phase stationnaire de croissance correspond à un pigment dont le groupement prosthétique d'après le spectre de l'hémochrome de pyridine, est apparenté à l'hème a.

3) la bande située à 630 mμ chez les levures en phase stationnaire de croissance n'a pu être assimilée à aucun pigment hématinique connu (catalase, peroxydase, cytochrome a_2).

4) bien que la tentative d'isolement des porphyrines libres ait échoué, il n'est pas exclu que les bandes observées durant la phase stationnaire de croissance correspondent simplement à des pigments résultant de la dégradation intracellulaire des hémoprotéines de la phase exponentielle de croissance.

C H A P I T R E II

ETUDE DES TRANSFORMATIONS DU SPECTRE CYTOCHROMIQUE PAR AERATION DE LA LEVURE RECOLTEE AU COURS DE SA CROISSANCE ANAEROBIE.

Plusieurs auteurs ont constaté des variations du spectre cytochromique des microorganismes suivant les conditions d'aération des cultures; ces variations se traduisent dans tous les cas par la disparition dans les cultures anaérobies des cytochromes appartenant à la chaîne respiratoire classique. Ce phénomène a été observé en particulier chez Aspergillus oryzae par Tamiya (101), chez Bacillus cereus par Schaeffer (102) et chez Bacillus coagulans par Chaix et Flamens (103).

Les rapports entre le mode de culture, la composition cytochromique et l'activité respiratoire des cellules de levure ont été établis en 1933 par Fink et Berwald (98). Ces auteurs ont observé que le spectre cytochromique de la levure de brasserie (levure dont le métabolisme est surtout fermentaire) présente à la température ordinaire une bande α principale b + c située entre 568 mμ et 544 mμ. Ce spectre peut se transformer au cours d'une culture prolongée fortement aérée en un spectre classique à trois bandes α: aα = 604 mμ, bα = 564 mμ, cα = 550 mμ, caractéristique de la levure de boulangerie, levure dont la respiration est intense. Chin, en 1959 (99), a repris ce problème: il a étudié cette transformation des levures de brasserie non plus chez des cellules en croissance, comme Fink et Berwald, mais chez des levures non proliférantes, aérées dans du tampon glucosé, ce qui excluait la possibilité d'une sélection.

En 1950 également, Ephrussi et Slonimski (33) ont donné la preuve, pour la première fois dans des conditions rigoureuses, que la synthèse des cytochromes

de la chaîne respiratoire était un processus adaptatif dépendant de la présence d'oxygène moléculaire. Ayant récolté des des levures au cours de leur croissance en anaérobiose stricte, ils ont constaté que ces levures présentaient un spectre complètement dépourvu de cytochrome c et de cytochrome a + a_3 (voir page 43), puis par aération dans du tampon phosphate glucosé, ils ont constaté au fur et à mesure que l'activité respiratoire augmentait, l'apparition des bandes α des cytochromes c, c_1, b et a + a_3.

Chin d'une part (99), Ephrussi et Slonimski d'autre part (33), ont interprété leurs observations en faisant l'hypothèse que les cytochromes anaérobies sont des précurseurs des cytochromes aérobies. Cette hypothèse a également été avancée récemment par Hennessy (104) qui a observé chez la levure de brasserie cultivée en anaérobiose, un spectre à deux bandes α situées à la température ordinaire à 558 mμ et à 590 mμ *.

Slonimski (33) a suggéré en particulier que le cytochrome b_1 pourrait être précurseur du cytochrome c car il n'a observé à -190° chez la souche de levure "petite colonie", levure à déficience respiratoire dépourvue de cytochrome oxydase, que le spectre du cytochrome b_1 en anaérobiose et celui du cytochrome c en aérobiose (de plus dans les deux cas, il a observé une bande faible située vers 580 mμ). Ces observations ont été faites par simple examen spectroscopique.

Ayant mis en évidence que la levure cultivée en anaérobiose ne présente pas le même spectre en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance, nous avons entrepris de suivre d'une façon systématique par spectrographie à basse température, l'apparition des bandes α des cytochromes de la chaîne respiratoire au cours de l'aération des levures récoltées en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance anaérobie. Nous avons fait cette étude sur la souche normale et

---

* Hennessy observe qu'après incubation des levures une nuit à 37°, ces bandes disparaissent et sont remplacées par des bandes situées à 549 mμ et à 583 mμ. Après cette incubation, les levures se sont autolysées et ne sont plus viables; les pigments correspondant à ces bandes d'absorption sont localisés dans le surnageant obtenu par centrifugation des levures autolysées.Cet auteur suppose que les pigments correspondant à ces bandes sont des intermédiaires dans la synthèse des cytochromes aérobies. Il nous semble plutôt que cette observation est à rapprocher d'une part des résultats de Kench (105), d'après lesquels il y aurait une formation de coproporphyrines lors du catabolisme des hémoprotéines intracellulaires des cellules de levure de bière mortes ou endommagées et, d'autre part, des résultats de Keilin et Tissières (106) qui mettent en évidence l'apparition de porphyrine libre (dont les bandes d'absorption sont situées à 587 et à 548 mμ) dans le mycelium autolysé de Neurospora crassa.

sur la souche mutante "petite colonie". Nous nous sommes limités à l'étude des bandes α. Les courbes spectrales ont été obtenues sans addition de réducteur.

Les levures sont cultivées en anaérobiose sur milieu complexe à base d'extrait de levure ou sur milieu synthétique dans des ballons de 750 ml contenant 400 ml de milieu. Elles sont récoltées et lavées par centrifugation dans du tampon phosphate M/15 pH 4,6. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans le même tampon additionné de glucose 0,5 % et placé dans des récipients agités à raison de 130 oscillations par minute et dans lesquels on maintient un barbotage d'air; les opérations sont réalisées stérilement dans la mesure du possible.

I - Transformation du spectre de la souche normale.

Ces transformations ont été étudiées dans le cas des cultures sur milieu à base d'extrait de levure et dans le cas des cultures sur milieu synthétique (83).

A - Cultures sur milieu à base d'extrait de levure.

1- Levures récoltées en phase exponentielle de croissance.

La figure 13-A montre les transformations du spectre des levures provenant de cultures anaérobies récoltées à une densité optique de 32 U.C., en fonction de la durée de l'aération. Les longueurs d'onde exactes auxquelles correspondent les différents maxima d'absorption sont indiquées dans le Tableau VIII. Après une heure d'aération, une absorption correspondant au cytochrome c se manifeste à 547 mμ. Après 3 heures d'aération, on observe le spectre caractéristique des levures cultivées en aérobiose. On n'observe pas la disparition des bandes α du cytochrome b_1, les cytochromes c_1 et b absorbant aux mêmes longueurs d'onde.

2- Levures récoltées en phase stationnaire de croissance.

La figure 14 représente les transformations du spectre des levures récoltées à une densité optique de 240 U.C.. Les positions des sommets des courbes spectrales sont données dans le Tableau VIII. L'induction se manifeste d'abord par l'apparition des bandes $c\alpha$ = 548 mμ, $c_1\alpha$ = 552,5 mμ et $b\alpha$ = 558 mμ, déjà très intenses après 15 minutes d'aération. La bande correspondant aux cytochromes a + a_3 n'est décelable

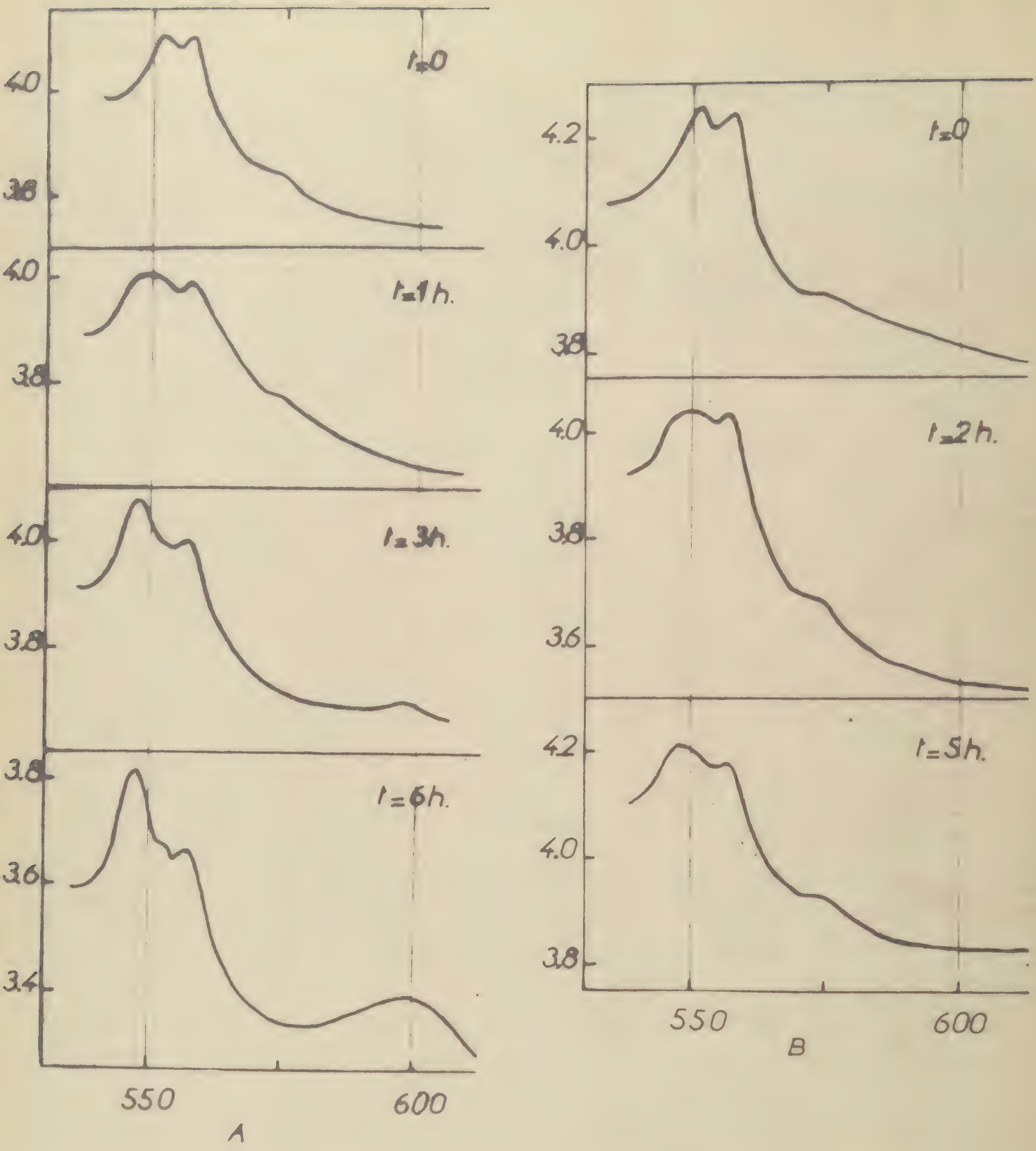


Figure 1: Induction par l'oxygène du système cytochromique respiratoire chez les levures (souche normale) récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie.
La durée de l'aération des cellules est indiquée pour chaque spectre.
A- Culture sur milieu à l'extrait de levure.
B- Culture sur milieu synthétique.
Densité optique de la culture au moment de la récolte: A = 32 U.C., B = 35 U.C.
e = 1 mm.

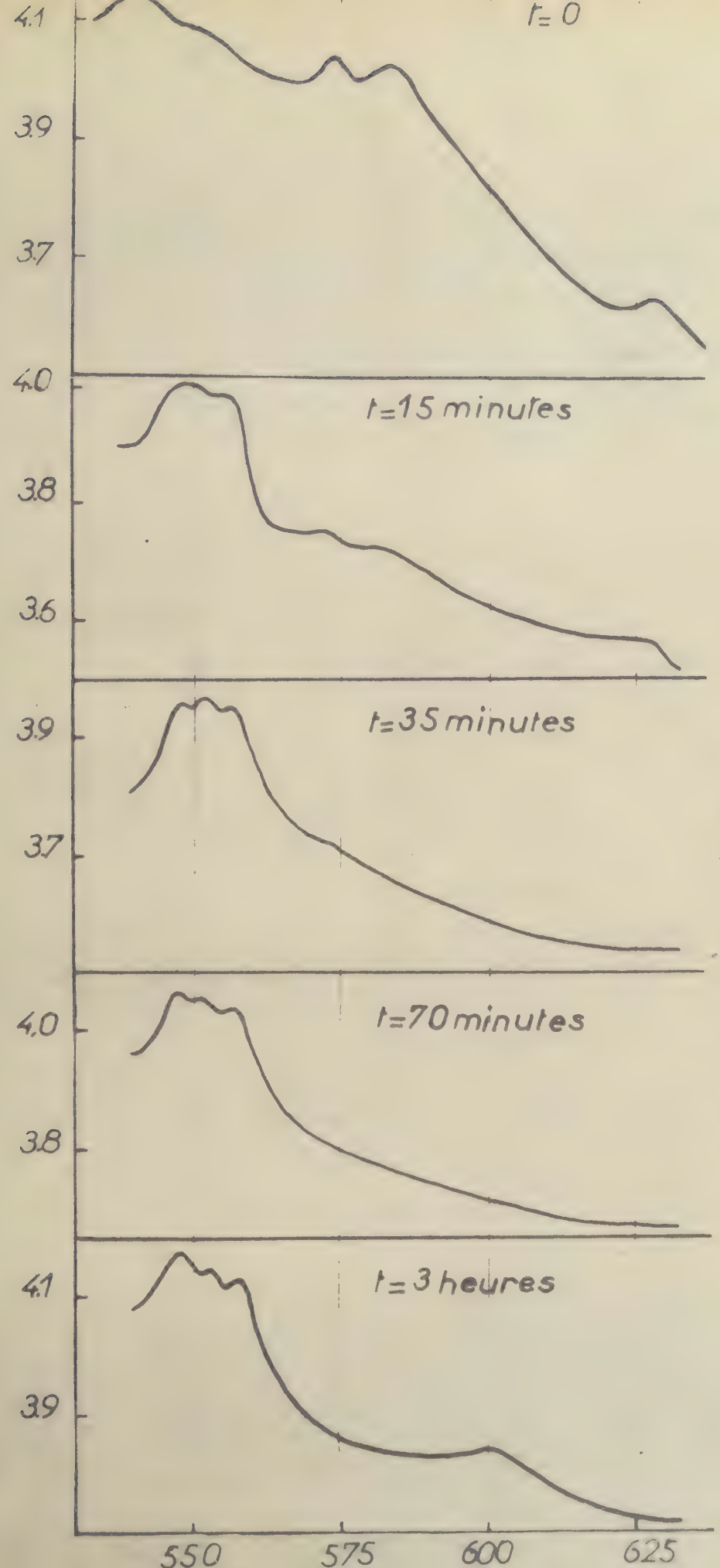


Figure 14: Induction par O_2 du système cytochromique respiratoire chez les levures (souche normale) récoltées (à 240 U.C.) en phase stationnaire de croissance sur milieu à l'extrait de levure. La durée de l'aération des cellules est indiquée pour chaque spectre. e = 1 mm.

Tableau VIII: Variations des positions des sommets des spectres d'absorption des cellules de levure, souche normale, cultivées sur milieu à l'extrait de levure, en fonction de la durée d'aération.

I- Récolte de la culture en phase exponentielle de croissance (spectres de la figure 13 A).

II - Récolte de la culture en phase stationnaire de croissance (spectres de la figure 14).

Durée de l'aération	I — Position des sommets mμ						
0 h.		552,5	558	574,5			
1 h.	547,5 à	552,5	558	574,5			
3 h.	547	553	558			600 (faible)	
6 h.	547	553	558			600	

	II						
0 h.			555		574,5	583,5	630
15 min.	548 à	552,5	558		575	583,5	630
35 min.	547	552,5	558				
1 h. 10	547	552,5	558				
3 h.	547	552,5	558			600	

par spectrographie qu'après deux heures environ d'aération. Il convient de remarquer à ce sujet que la sensibilité des plaques photographiques utilisées est meilleure aux environs de 550 mμ qu'aux environs de 600 mμ. Aussi, dans cette dernière région, de faibles bandes d'absorption sont difficilement décelables avec certitude. Notons que chez des levures récoltées après des durées d'incubation plus longues, nous avons pu constater l'apparition des cytochromes c, c_1 et b après quelques minutes d'aération.

B - Cultures sur milieu synthétique.

D'après Slonimski (107), l'adaptabilité respiratoire est pratiquement nulle chez les levures récoltées en phase exponentielle de croissance sur milieu contenant NH_4^+ comme source d'azote.

Nous avons constaté que dans ce cas, l'adaptation, se manifestant par l'apparition de la bande α du cytochrome c, est beaucoup plus lente que dans le cas des levures cultivées sur milieu complexe (figure 13-B).

Chez les levures récoltées en phase stationnaire de croissance, l'induction progresse à la même vitesse que dans le cas des levures cultivées sur milieu à l'extrait de levure.

II - Etude spectrographique de la souche mutante "petite colonie".

Nous avons d'abord spectrographié les cellules de levures cultivées en aérobiose. Nous avons ensuite étudié les transformations spectrales au cours de l'aération des levures cultivées en anaérobiose sur milieu complexe à base d'extrait de levure.

A - Spectre des cellules cultivées en aérobiose.

Récoltées en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance, les cellules cultivées en aérobiose présentent une bande cα très intense et une bande bα peu intense, et particulièrement faible en phase stationnaire de croissance. Cette bande dont la position paraît identique à celle du cytochrome b des levures normales doit correspondre à la bande désignée par bx par Ephrussi et coll. (44).

Un léger épaulement signale la présence de la bande $c_1\alpha$ plus ou moins masquée par la bande $c\alpha$. On n'observe pas: la bande $(a + a_3)\alpha$ (figure 15). On observe également une très légère absorption à 575 mμ; cette bande disparaît par addition d'hydrosulfite.

Le spectre de l'hémochrome de pyridine présente à -190° une bande située à 548 mμ correspondant à l'hème c et une bande située à 555 mμ correspondant au protohème. On n'observe pas d'absorption vers 590 mμ correspondant à un hème de type a.

B - Transformation par aération du spectre des cellules récoltées au cours de leur croissance anaérobie.

1 - Levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie.

A la température de l'azote liquide la souche mutante (récoltée à 54 U.C.) présente les bandes α situées à 552,5 mμ et à 558 mμ. On ne distingue pas la bande à 574,5 mμ peut-être à cause de la trop faible concentration du pigment correspondant. Comme dans le cas de la souche normale, on n'observe pas au cours de l'aération la disparition des bandes situées à 552,5 mμ et 558 mμ. Après trois heures d'aération, le spectre d'absorption présente 3 bandes α situées à 547 mμ, 552,5 mμ et 558 mμ. On n'observe pas, même après 6 heures d'aération, d'absorption due aux cytochromes $a + a_3$ (figure 16-A).

2 - Levures récoltées en phase stationnaire de croissance anaérobie.

Les bandes d'absorption du cytochrome b_1 subsistent mais sont beaucoup moins intenses qu'en phase exponentielle de croissance. Comme chez la souche normale, le spectre présente des bandes d'absorption situées à 540 mμ, 575 mμ et 630 mμ. Il est difficile d'apprécier si le léger épaulement de la courbe d'absorption à 590 mμ est significatif.

Comme chez la souche normale, l'adaptation est beaucoup plus rapide que celle des levures récoltées en phase exponentielle de croissance. Elle se manifeste déjà après 11 minutes d'aération par une augmentation de l'absorption à 549 mμ. Après une heure d'aération, le spectre présente des bandes d'absorption très nettes situées à 547 mμ, 553 mμ, 558 mμ,et une faible bande située vers 575 mμ.(figure 16-B)

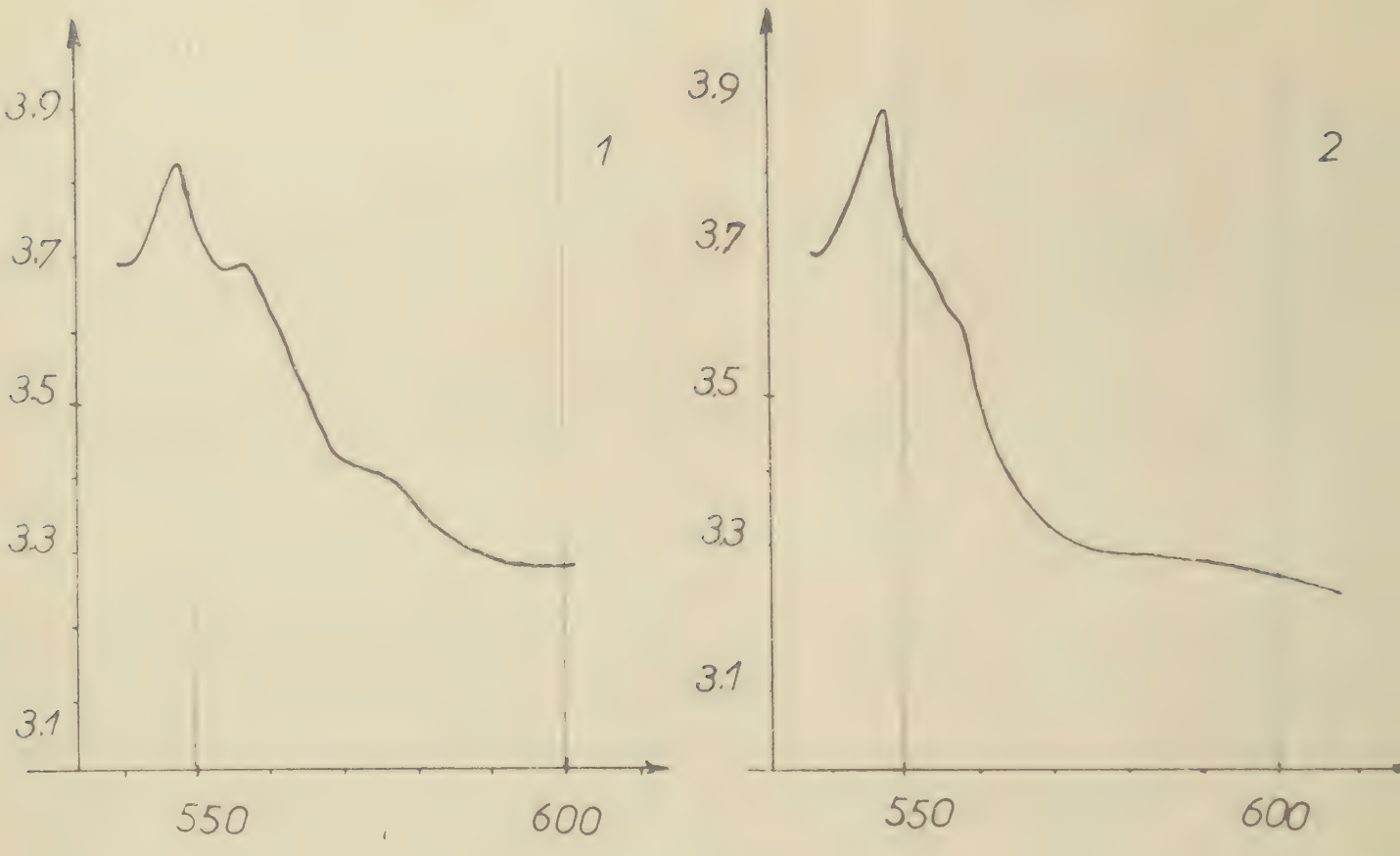
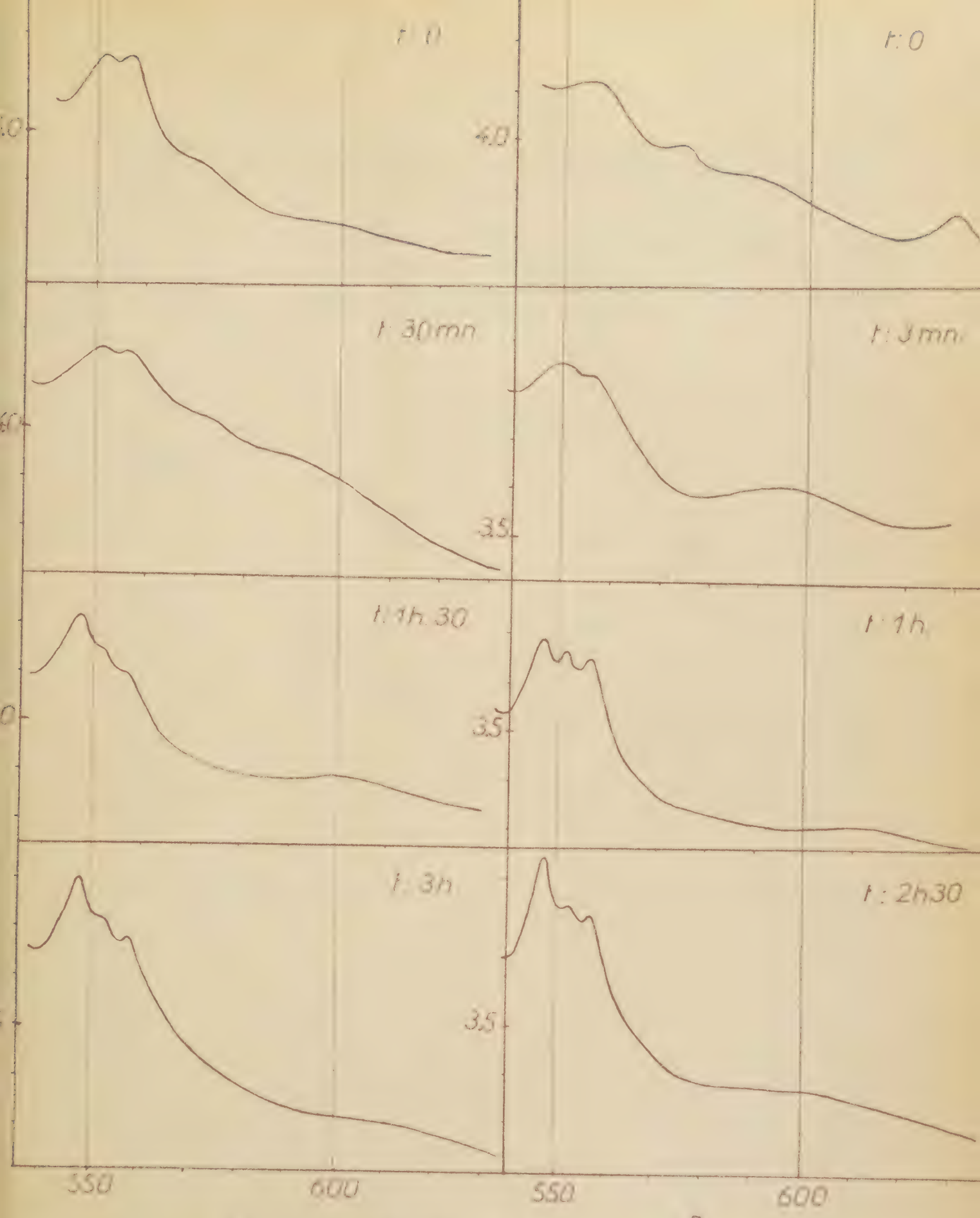


Figure 15

Figure 15: Spectres à -190° de la levure souche "petite colonie" cultivée en aérobiose. Réduction par les substrats endogènes. e = 1 mm.
1) Phase exponentielle de croissance (40 U.C.)
2) Phase stationnaire de croissance (400 U.C.).

Figure 16: Transformation par aération du spectre des cellules de levure (souche "petite colonie") récoltées au cours de leur croissance anaérobie (sur milieu à l'extrait de levure).
La durée de l'aération est indiquée pour chaque spectre.
A- Récolte de la culture en phase exponentielle de croissance (72 U.C.)
1) e = 1,5 mm 2), 3), 4) e = 2 mm
B- Récolte de la culture en phase stationnaire de croissance (342 U.C.)
1) e = 2 mm 2) e = 1,5 mm 3) e = 1 mm 4) e = 0,8 mm



A B

Figure 16

Tableau IX: Variations des positions des sommets des spectres d'absorption des cellules de levure, souche "petite colonie", cultivées sur milieu à l'extrait de levure, en fonction de la durée d'aération.

I - Récolte de la culture en phase exponentielle de croissance (spectres de la figure 16-A)

II - Récolte de la culture en phase stationnaire de croissance (spectres de la figure 16-B)

Durée de l'aération	Position des sommets (mμ)					
	I					
0 h.		552,5	558	575 (très faible)		
30 min.		552,5	558	575 ?		
1 h.30	547	553	558			
3 h.	547	553	558			
6 h.	547	552,5	558			
	II					
0 h.		555		575		630
3 min.	548 à 552		558		590 ?	
1 h.	547	553	558			
2 h.30	547	553	558			

Les positions des maxima des courbes d'absorption de la figure 16 sont précisées dans le Tableau IX.

Discussion.

Les expériences réalisées ont permis de définir exactement les transformations du spectre hématinique des levures récoltées au cours de leur croissance anaérobie quand ces levures sont soumises à une simple aération.

Comme Slonimski, nous avons observé:

1- que la biosynthèse des enzymes respiratoires est beaucoup plus lente quand la croissance anaérobie de la levure a eu lieu sur un milieu contenant NH_4^+ comme source d'azote que quand elle a eu lieu sur un milieu riche en acides aminés (dans le cas des cellules récoltées en phase exponentielle de croissance).

2- que cette biosynthèse est très lente quand les cellules proviennent d'une culture en phase exponentielle de croissance et rapide lorsqu'elles proviennent de cultures en phase stationnaire de croissance sur milieu à l'extrait de levure ou sur milieu synthétique, le retard de la synthèse des enzymes respiratoires lors de l'aération des levures de phase exponentielle pouvant être dû, comme Slonimski et coll. en ont fait l'hypothèse, soit à l'absence d'un pool intracellulaire d'acides aminés libres (107), soit à une déficience en un cofacteur (108, 109, 110). Nous avons nous-mêmes observé (voir page 96) que l'adaptation mesurée par l'augmentation de la vitesse de respiration présente un temps de latence chez les cellules entières alors qu'elle commence dès l'introduction d'oxygène chez les protoplastes de levures (obtenus par digestion de la paroi cellulaire par le SHP).

Mais la question principale que nous nous sommes posée ici concerne la relation existant entre les pigments hématiniques observés en aérobiose et en anaérobiose. Nous allons discuter dans quelle mesure nos résultats sont en faveur ou non de l'hypothèse d'après laquelle les substances hématiniques de la levure cultivée en anaérobiose seraient précurseurs des cytochromes aérobies.

A - Le cytochrome b_1 peut-il être envisagé comme précurseur des cytochromes b, c_1 ou c qui apparaissent durant l'aération dans la même région spectrale?

1- Il n'y a aucun argument en faveur de l'hypothèse d'après laquelle le cytochrome b_1 serait un précurseur spécifique du cytochrome c. En effet, notre étude spectrographique révèle que la souche mutante "petite colonie" possède comme la souche normale des bandes d'absorption à 552,5 mμ et à 558 mμ en aérobiose; ces bandes sont difficiles à distinguer par simple examen spectroscopique car elles sont plus ou moins masquées par la bande cα particulièrement intense; elles peuvent correspondre soit aux cytochromes c_1 et b, soit au cytochrome b_2 récemment isolé par Gregolin et Ghiretti-Magaldi (111) à partir d'une souche de levures "petite colonie", soit au cytochrome absorbant aux mêmes longueurs d'onde, que nous avons pu mettre en évidence dans une fraction particulaire des cellules de la souche normale (voir p. 83).

2- Dans le cas des levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie, on ne peut distinguer au cours de l'aération la disparition du cytochrome b_1, les bandes d'absorption des cytochromes c_1 et b étant situées aux mêmes longueurs d'onde que celles du cytochrome b_1. Cependant, l'hypothèse d'après laquelle le cytochrome b_1 serait également présent en aérobiose doit être exclue car, ainsi que nous le verrons au Chapitre II de la troisième Partie, la réduction par l'ascorbate ne fait apparaître dans les fractions subcellulaires de levure cultivée en aérobiose, aucune absorption à 558 mμ alors que le cytochrome b_1 (absorbant à cette longueur d'onde) est réductible par l'ascorbate.

Nos observations diffèrent de celles de Lindenmayer et Estabrook (30) qui constatent au cours de l'adaptation un déplacement progressif des bandes d'absorption correspondant à la disparition du cytochrome b_1 corrélativement à l'apparition des cytochromes c, c_1 et b. Ces auteurs situent à la température de l'azote liquide les bandes α du cytochrome b_1 à 551 mμ et 557 mμ ou 558 mμ et après aération cα à 549 mμ, $c_1\alpha$ à 554 mμ, bα à 559,5 mμ. Ces trois dernières positions ne coïncident ni avec celles données par Ephrussi et Slonimski (33), ni avec celles que nous mesurons sur nos enregistrements.

Ces différences peuvent provenir:

1) soit de l'agent réducteur, l'hydrosulfite en poudre, employé par Lindenmayer et Estabrook. En effet, l'hydrosulfite utilisé non en solution mais en poudre, en dénaturant les protéines, peut provoquer de très notables variations spectrales;

2) soit du système spectrophotométrique ayant peut-être une dispersion insuffisante;

3) soit de ce que les observations de ces auteurs n'aient pas été analysées avec une rigueur suffisante comme on peut en juger par l'exemple suivant: ces auteurs déclarent que dans les cellules intactes le cytochrome b_1, contrairement au cytochrome purifié b_2, présente à la température de l'azote liquide un spectre comportant une seule bande β. Or, sur les courbes spectrales publiées par ces auteurs eux-mêmes (figure 2 p. 71), on distingue clairement les deux bandes β du cytochrome b_1 que nous aussi d'ailleurs observons très distinctement sur nos enregistrements.

3- Le cytochrome b_1 est à peine décelable et peut même disparaître complètement chez les levures récoltées en phase stationnaire de croissance anaérobie alors qu'après moins de 15 minutes d'aération, se manifeste aux environs de 550 mμ, une très forte absorption correspondant aux bandes α plus ou moins fusionnées des cytochromes c, c_1 et b.

En résumé, nos observations sont difficilement conciliables avec l'hypothèse d'après laquelle le cytochrome b_1 est précurseur en particulier des cytochromes c, c_1 ou b.

B - <u>Le pigment anaérobie dont la bande α est située à 583,5 mμ peut-il être envisagé comme précurseur du cytochrome a</u> ?

Slonimski (35) a suggéré que le pigment absorbant aux environs de 580 mμ et qu'il appelle cytochrome a_1, serait précurseur des cytochromes a et a_3.

Les résultats de nos expériences avec les levures "petite colonie" semblent en faveur de cette hypothèse; chez ces levures en effet, on peut supposer une corrélation entre l'absence d'absorption à 583,5 mμ en anaérobiose et l'absence des cytochromes a et a_3 en aérobiose. En ce qui concerne la levure de souche normale, nos résultats sont beaucoup moins en faveur de cette hypothèse. En effet, bien que ne possèdant pas

de bande d'absorption à 583,5 mμ, la levure de phase exponentielle de croissance anaérobie est capable de synthétiser en présence d'oxygène les cytochromes a et a_3; la bande à 583,5 mμ n'apparaît pas non plus au cours de l'adaptation de ces cellules à l'oxygène.

S'il est difficile de supposer que tel pigment anaérobie puisse être précurseur direct de tel pigment aérobie, il est possible que les groupements prosthétiques des pigments anaérobies représentent une réserve d'hème utilisée lors de la formation des cytochromes aérobies sous l'influence de l'oxygène. Cette synthèse ne semble pas limitée en anaérobiose par une concentration insuffisante en groupements tétrapyrroliques susceptibles de se transformer en groupements hématiniques; Slonimski a établi que l'excrétion de porphyrine dans les milieux de culture est 10 à 20 fois plus forte en anaérobiose qu'en aérobiose bien que la teneur en hémoprotéines soit plus faible en anaérobiose.(35).

L'hypothèse de la biosynthèse de novo de l'apoenzyme est appuyée par les résultats de Ycas et Drabkin (82). Ces auteurs observent au cours de l'adaptation de la levure cultivée en anaérobiose et exposée à l'oxygène une incorporation de glycine ^{14}C dans la protéine du cytochrome c. De plus, Katterman et Slonimski (112) ont montré que des analogues d'acides aminés inhibent en particulier la biosynthèse de la cytochrome oxydase au cours de l'adaptation des levures cultivées en anaérobiose. Enfin, de nombreux travaux ont établi que la formation des enzymes est liée à l'utilisation d'un pool d'acides aminés libres (113).

Il est donc possible que l'induction par l'oxygène corresponde en ce qui concerne les cytochromes à un transfert d'hémine sur un nouvel apoenzyme.

Conclusions.

Nous avons étudié par spectrographie à basse température l'évolution sous l'influence de l'oxygène de l'air du spectre cytochromique des levures (souche normale et souche mutante "petite colonie") cultivées en anaérobiose, en vue d'obtenir des données complémentaires sur les relations existant entre les cytochromes anaérobies et les cytochromes aérobies.

Les principales observations que nous avons faites concernant ce problème sont les suivantes:

1- au cours de l'adaptation des levures de phase exponentielle de croissance anaérobie, nous n'avons pu observer ni chez la souche normale, ni chez la souche mutante, la disparition des bandes situées à 552,5 mμ et à 558 mμ. En effet, d'après l'étude spectrographique il est impossible de savoir si les bandes $c_1\alpha$ et $b\alpha$ se substituent ou se superposent aux bandes α du cytochrome b_1 situées aux mêmes longueur d'onde. Cependant, les résultats spectrographiques concernant la réduction par l'ascorbate des pigments des fractions subcellulaires permettent d'exclure l'hypothèse d'après laquelle le cytochrome b_1 serait également présent en aérobiose (voir 3ème Partie, Chapitre II) Notons que la souche mutante "petite colonie" se distingue de la souche normale non par la disparition des bandes $c_1\alpha$ et $b\alpha$ (ou b_2) mais seulement par leur atténuation et par la disparition de la bande $(a + a_3)\alpha$.

2- lors de l'adaptation des cellules de phase exponentielle et de phase stationnaire de croissance anaérobie, les cytochrome $a + a_3$ semblent être synthétisés après les cytochromes c, c_1 et b.

3- nos résultats ne sont pas en faveur de l'hypothèse d'après laquelle le cytochrome b_1 serait précurseur direct des cytochromes c, c_1 ou b, et le cytochrome 583,5 mμ précurseur direct des cytochromes a et a_3.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE LA LEVURE RECOLTEE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons analysé en fonction des phases de croissance et des conditions de vie aérobie ou anaérobie, l'évolution des sytèmes hématiniques de la levure déterminant des variations dans les proportions relatives des différentes bandes d'absorption ainsi que la disparition de certaines d'entre elles corrélativement à l'apparition d'autres. La constitution du spectre hématinique étant maintenant clairement définie, il devient possible d'aborder l'étude de la répartition intracellulaire de ces pigments. Dans ce but, nous avons mis au point une technique de fractionnement permettant de sauvegarder autant que possible l'intégrité des structures subcellulaires. Cette technique n'est applicable qu'aux levures récoltées durant la phase exponentielle de croissance car pendant la phase stationnaire, leur paroi n'est plus attaquée par le suc digestif d'Helix pomatia (cf. Première partie, Chapitre III). Le fractionnement des cellules de phase stationnaire n'a pu être réalisé qu'après broyage mécanique à l'aide du "Zell Homogenisator". Dans ces conditions, les structures subcellulaires sont complètement désintégrées et l'analyse de la répartition des pigments dans les différents types de particules devient impossible. Une telle analyse présenterait d'ailleurs beaucoup moins d'intérêt qu'au cours de la phase exponentielle car il est possible que certains pigments de la phase stationnaire de croissance anaérobie résultent de la dégradation d'hémoprotéines synthétisées durant la phase de multiplication active.

Le premier chapitre de la troisième partie de cet exposé concerne les caractères morphologiques (examen au microscope à contraste de phase et au microscope électronique) des fractions subcellulaires que nous avons isolées.

Le deuxième chapitre se rapporte à la distribution des cytochromes dans les différentes fractions subcellulaires.

Le troisième chapitre concerne l'aptitude respiratoire des particules isolées.

Toutes les préparations de fractions subcellulaires de levures ont été obtenues à partir de cultures récoltées pendant la division qui précède la dernière division de la phase exponentielle de croissance. Dans le cas des levures cultivées en anaérobiose, la récolte est effectuée suivant les conditions décrites page 18. Cette technique évitant le contact des cellules avec l'air au cours de la récolte, permet d'avoir des fractions subcellulaires n'ayant pas subi un début d'adaptation à l'aérobiose; ces précautions sont indispensables tant que les levures se trouvent en présence d'un substrat tel que le glucose du milieu de culture dont la dégradation fournit l'énergie nécessaire aux synthèses adaptatives. Notons que chez les levures récoltées pendant la dernière division de la phase exponentielle, l'adaptation se manifeste plus rapidement que chez les levures récoltées au milieu de cette phase.

C H A P I T R E I

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES PREPAREES A PARTIR DE LEVURES RECOLTEES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE.

Depuis les premières observations de Guillermond sur le chondriome des levures et des champignons (114), de nombreux auteurs ont signalé l'existence dans la cellule de levure cultivée en aérobiose, de particules cytoplasmiques présentant les mêmes réactions de coloration que les mitochondries des cellules animales (115-120) Cependant, l'identification de ces particules de petite taille a donné lieu à de nombreuses controverses (121) tant que le problème a été abordé par les méthodes cytologiques classiques.

Grâce à une étude au microscope électronique, Agar et Douglas (20) en 1957, ont observé sur des coupes ultra-minces deslevures cultivées en aérobiose des particules situées à la périphérie de la cellule, présentant une double membrane et une structure interne analogue à celle des mitochondries de cellules de mammifères (122, 123). Agar et Douglas ont pu distinguer les particules mitochondriales d'autres particules peu denses dépourvues de structure interne dont le contenu est soluble dans le toluène et qu'ils interprétèrent comme étant des granulations de réserve. Différents auteurs (21, 22, 23) ont ensuite réussi des micrographies électroniques de coupes de levures aérobies, révélant beaucoup plus clairement la structure intracellulaire et la présence de mitochondries.

D'autre part, en 1958, Raut-Hebb et coll. (124), Vanderwinkel et coll.(125) ont présenté des micrographies électroniques non plus de coupes, mais de particules isolées par fractionnement, après désintégration mécanique des cellules de levure. Sur les clichés, on bbserve des mitochondries rondes, gonflées, sous forme de vésicules de 0,5 à 1 μ de diamètre. Récemment, Vitols et Linnane (126) ont obtenu dans le

saccharose 1,0 M, une fraction constituée presque exclusivement de mitochondries. Certaines d'entre elles sont gonflées et d'autres ont conservé leur structure interne.

Raut-Hebb et coll. (124) ont observé dans le culot de centrifugation (sédimentation à 197.000 g pendant 1 heure dans du tampon phosphate 0,05 M) d'un homogénat préalablement débarrassé des cellules entières et des gros débris cellulaires les constituants suivants: 1) des vésicules de 0,5 à 1 μ correspondant probablement à des mitochondries; 2) des granulations de 0,2 à 0,3 μ de diamètre qui sont peut-être des granulations de réserve; 3) des membranes sur lesquelles sont fixées des particules denses d'un diamètre d'environ 30 mμ analogues aux grains de Palade (127). De telles particules ribosomiques ont été également signalées chez la levure par plusieurs auteurs (125, 128, 129).

Tous ces travaux ne concernent que la levure cultivée en aérobiose. Aucune étude morphologique de la levure cultivée en anaérobiose ou de ses fractions n'avait été faite jusqu'à présent. Seules avaient été recherchées des activités enzymatiques de broyats de levures récoltées au cours de leur croissance anaérobie (35, 130).

Il se posait donc la question importante de savoir en quoi les particules présentes dans les levures cultivées en anaérobiose ressemblent ou diffèrent des particules présentes dans les levures cultivées en aérobiose. Une telle comparaison a pu être effectuée à l'aide de fractionnements réalisés dans les mêmes conditions, soit de levures cultivées en aérobiose, soit de levures cultivées en anaérobiose.

I - Préparation des fractions subcellulaires - Concentrations relatives en protéines de ces fractions.

La méthode de fractionnement que nous avons mise au point aboutit à la séparation de trois fractions insolubles A_1, A_2, A_3 pour les levures aérobies, N_1, N_2, N_3 pour les levures anaérobies (cf. 1ère Partie, chapitre III). Les conditions de fractionnement ont été choisies en vue d'éviter autant que possible la contamination mutuelle des fractions mitochondriales et ribosomiques. Les fractions A_1 et N_1 correspondent à une marge très étroite de sédimentation; la faible vitesse de centrifugation permet une sélection des particules les plus lourdes. Les fractions intermédiaires A_2 et N_2 sont relativement abondantes. Le Tableau X donne les conditions de

Fractions	Force centrifuge g.10³	Durée de centrif. (min.)	Levures cultivées en aérobiose				Levures cultivées en anaérobiose			
			Exp. I		Exp. II		Exp. I		Exp. II	
			Protéines				Protéines			
			mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Suspension S			356	100	608	100	218	100	530	100
Fraction 1	1-4	30	62	17,4	123	20,2	31	14,2	72	13,6
Fraction 2	4-25	45	115	32,3	182	30,0	61	28,0	126	23,8
Fraction 3	25-105	90	71	20,0	143	23,5	56	27,5	148	28,0
Surnageant de la fraction 3			103	29,0	169	27,8	68	31,2	185	35,1

Tableau X: Répartition des protéines de la suspension S dans les différentes fractions.

Les protéines sont mesurées par la méthode de Lowry. Les chiffres représentent la quantité totale de protéine de chacune des fractions obtenues, dans le cas des expériences I, avec une culture de 2 litres et dans le cas des expériences II avec 2 culturés de 2 litres, récoltées en phase exponentielle de croissance (60 U.C. soit 1,026 g de levures, poids sec/litre).

centrifugation pour chacune des fractions et leur concentration relative en protéines.

II - Examen morphologique des différentes fractions.

Chaque culot de centrifugation a été examiné au microscope à contraste de phase et au microscope électronique grâce à la collaboration de F. Zajdela. Les culots de centrifugation ont été fixés directement dans le fixateur de Palade (131) et inclus dans le mélange de méthacrylate de butyle et de méthyle (8/2). Les micrographies électroniques des coupes ultrafines (A_1 et N_1) ont été effectuées avec un microscope Siemens Elmiskop I après coloration à l'acétate d'uranyle (132).

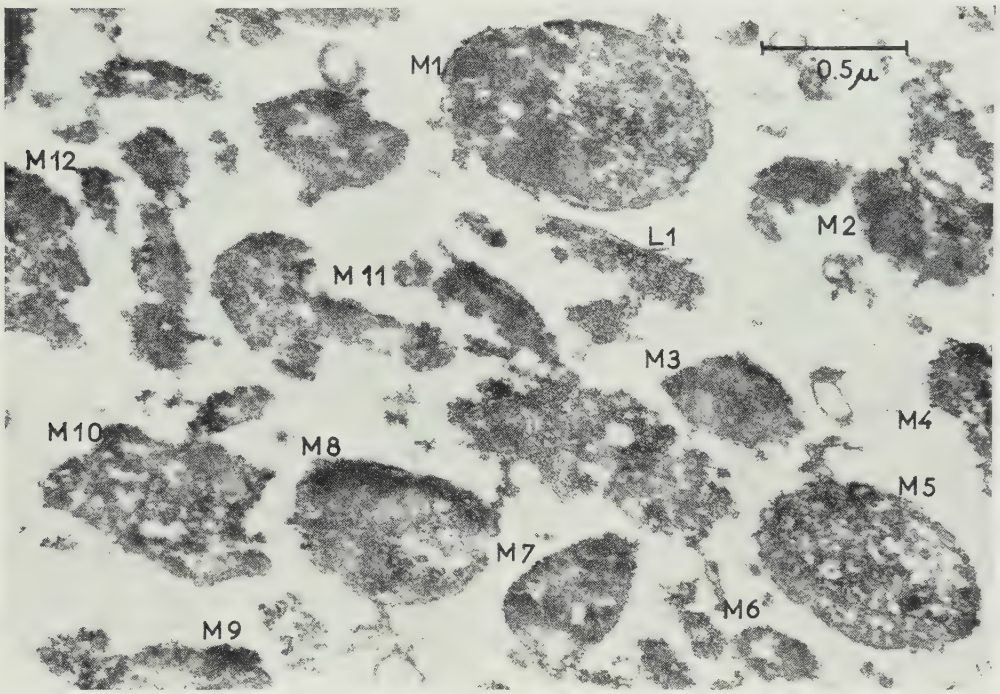
A - Fractions sédimentant entre 1.000 et 4.000 g.

1- Fraction A_1.

L'examen de cette fraction au microscope à contraste de phase montre qu'elle est constituée de particules denses, généralement allongées en forme de bacille, de 0,2 à 1 μ de diamètre. D'après les micrographies électroniques (planche I, figures 1 et 2) cette fraction (133) contient de nombreuses mitochondries (M) dont la double membrane est visible par endroits. Elles sont de taille très variable. Leur structure interne, très dense, laisse supposer qu'elles sont à l'état contracté. Un nombre assez important d'entre elles sont partiellement endommagées, mais restent denses, et conservent une structure malgré le traumatisme.

La fraction A_1 contient aussi un deuxième type de granulation (L) ayant la même taille que les plus grosses mitochondries; sans imprégnation à l'acétate d'uranyle, elles peuvent facilement être confondues avec des mitochondries. Elles possèdent une membrane limitante et sont remplies de grains de taille uniforme uranophiles. Elles semblent très fragiles; le fait qu'au moins une partie d'entre elles résiste à la destruction indique que la méthode d'isolement employée est assez conservatrice.

Cette fraction A_1 est contaminée par des débris cytoplasmiques, de petite taille, dont il eut été possible de la débarrasser en effectuant un lavage par centrifugation. Ceci n'a pas été fait car cette manipulation risquait de provoquer le départ, dans le milieu, de constituants intramitochondriaux.



Levures cultivées en aérobiose, fraction A_1.
Fig. 1. : M_1-M_{12}, mitochondries. La mitochondrie M_{11} est brisée.
L_1 débris d'une granulation de type non mitochondrial contenant des grains uranophiles.

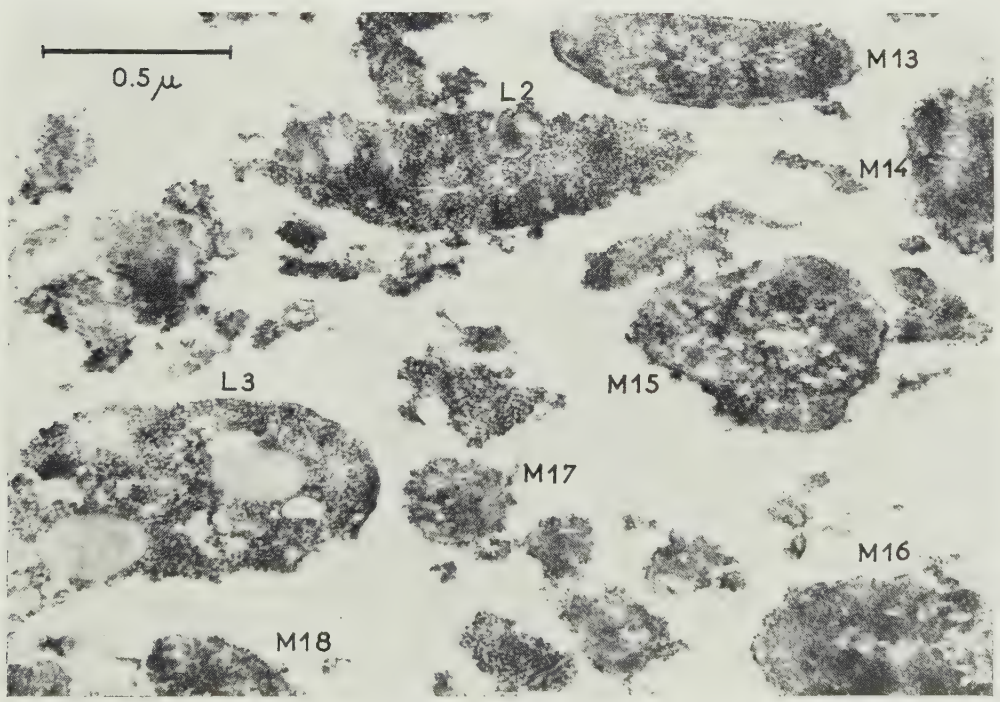


Fig. 2 : M_{13}-M_{18}, mitochondries; L_2-L_3, granulations non mitochondriales contenant des grains uranophiles.

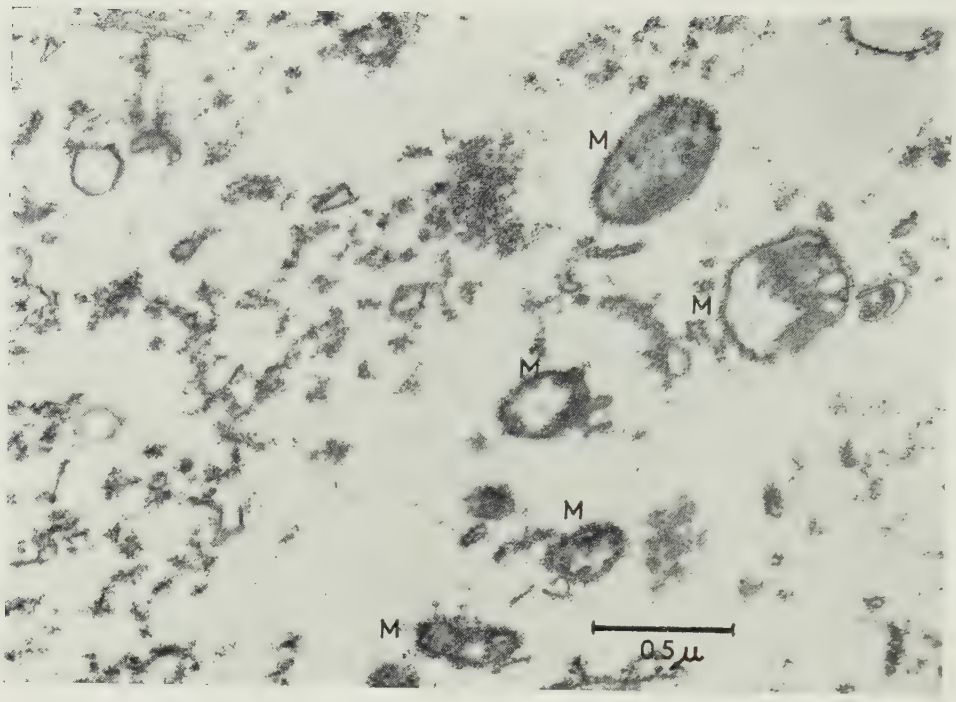


Fig. 3.

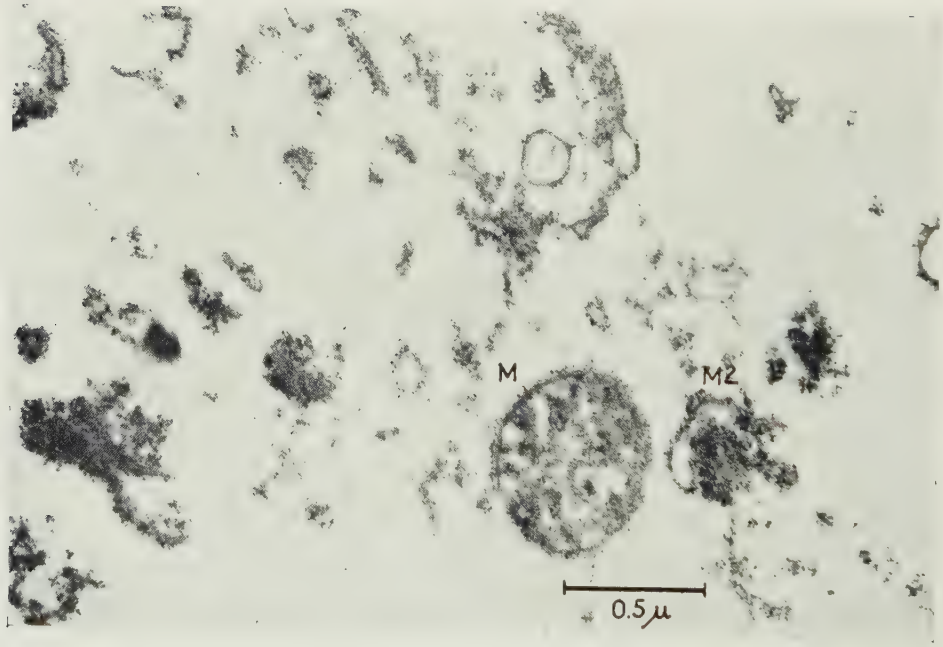


Fig. 4.

Levures cultivées en anaérobiose, fraction N_1.
Fig. 3 et 4 : M, particules de type mitochondrial;
M 2, particule de type mitochondrial en voie de formation ?

2- Fraction N_1.

Le culot de centrifugation est relativement moins important que dans le cas de la fraction A_1. Le Tableau X indique qu'il ne contient que 13% environ des protéines de la suspension S.

L'examen au microscope à contraste de phase montre que cette fraction N_1 est constituée de particules denses le plus souvent rondes, et généralement plus petites que les mitochondries aérobies.

Par micrographie électronique (133), (planche II, figures 3 et 4), on met en évidence des particules dont il est beaucoup moins facile d'apprécier la nature que dans le cas de la fraction A_1. Ces particules étant entourées d'une double membrane nettement visible sur les figures, peuvent être considérées comme des mitochondries plus ou moins complètes.

Dans le culot N_1, les débris cytoplasmiques de petite taille sont très abondants; ils sont composés de vésicules plus ou moins grandes et plus ou moins allongées entourées de ribosomes.

B - Fractions A_2 et N_2 sédimentant entre 4.000 et 25.000 g.

L'examen au microscope électronique révèle que les fractions A_2 et N_2 ont le même aspect. Elles contiennent un certain nombre de débris qui sont des morceaux de mitochondries ainsi que d'autres structures intracellulaires constituées en partie de petites granulations associées en général à des éléments membraneux.

C - Fractions A_3 et N_3 sédimentant entre 25.000 et 105.000 g.

Par examen au microscope électronique, on peut observer que les fractions A_3 et N_3 ne contiennent que de très petites granulations libres de taille homogène, correspondant aux ribosomes.

Discussion et conclusion.

La technique de fractionnement que nous avons mise au point nous a permis d'obtenir des fractions subcellulaires de levures aérobies dont l'homogénéité est une condition nécessaire à une étude effective de localisation intracellulaire d'enzymes.

L'examen au microscope électronique des mitochondries aérobies sédimentant à faible vitesse montre qu'elles sont denses et contractées, à la différence des mitochondries gonflées, ressemblant à des vésicules vides, séparées en même temps que de nombreux débris cellulaires par Vanderwinkel et coll. (125), dans un culot de centrifugation sédimentant entre 5.000 et 15.000 g (1 heure) dans le lactose 0,5 M ou par Raut-Hebb et coll. (124) dans les culots de centrifugation sédimentant entre 1.600 et 25.000 g dans le tampon phosphate.

Le deuxième type de particules contenues dans la fraction A_1 est peut-être à assimiler aux granulations basophiles des levures connues depuis longtemps par les cytologistes (134) ou aux lysosomes (135) des cellules animales dont la présence a été signalée récemment dans certaines cellules végétales (136).

L'existence de telles particules n'apparaissait pas clairement dans les micrographies électroniques d'homogénat de levure publiées jusqu'ici (124, 125, 126).

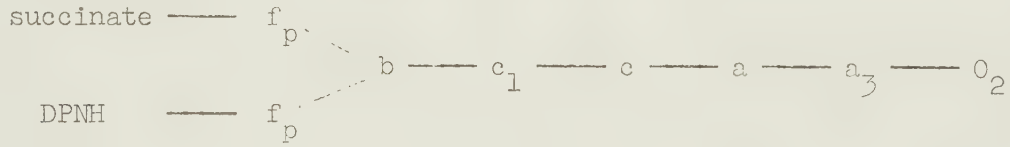
En ce qui concerne les levures cultivées en anaérobiose, nous avons pu montrer qu'elles possèdent des particules moins organisées que les mitochondries aérobies, mais nettement apparentées au point de vue morphologique à des particules mitochondriales. La fragilité de ces structures rend leur séparation sous forme d'une fraction homogène beaucoup plus difficile à réaliser que dans le cas des levures cultivées en aérobiose.

C H A P I T R E II

ETUDE DE LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES CYTOCHROMES DE LA LEVURE RECOLTEE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE.

Dans les particules obtenues par notre technique de fractionnement des cellules de levure, le spectre cytochromique ne peut jamais être observé directement (à température ordinaire ou à -190°) car les pigments s'y trouvent à l'état oxydé; en effet, les substrats capables de réduire ces pigments ont été épuisés ou éliminés au cours des manipulations. Leur réduction par l'hydrosulfite fait apparaître le spectre d'absorption global de tous les pigments présents dans telle ou telle fraction particulaire. Il nous a paru intéressant de chercher à obtenir la réduction sélective de ces pigments par des substrats de la chaîne respiratoire en vue de déterminer sur quelle chaîne de transfert d'électrons ils fonctionnent.

Le schéma du transfert des électrons au cours de la respiration tel que le donne, en particulier, Chance, est le suivant (137):



f_p représentant les enzymes flaviniques responsables de l'oxydation du DPNH et du succinate. Dans la respiration terminale, le DPN est le coenzyme de déshydrogénation de nombreux substrats. La déshydrogénation du succinate se fait sans l'intervention du DPN.

Nous avons systématiquement recherché si DPNH, le succinate ou l'ascorbate étaient capables de réduire telle ou telle composante du spectre hématinique de chacune des fractions subcellulaires que nous avons isolées. De plus, nous avons

utilisé comme réducteur le DL-lactate: on sait en effet que la levure cultivée en aérobiose possède en particulier une lacticodéshydrogénase de constitution hématinique, le cytochrome b_2, capable d'oxyder le L-lactate et de réduire le cytochrome c. Enfin, comme les bandes d'absorption α du cytochrome b_1 occupent les mêmes positions que celles du cytochrome b_2 et des cytochromes c_1 et b, nous avons, en même temps que les études spectrales, effectué des mesures d'activité lacticodéshydrogénase en vue de connaître la répartition de cette activité dans les différentes fractions subcellulaires.

I - ETUDE SPECTROGRAPHIQUE DES DIFFERENTES FRACTIONS.

Les études spectrographiques sont faites directement sur les culots de centrifugation constituant les différentes fractions particulaires. Après introduction de l'agent réducteur, la cuve contenant la préparation est refermée. L'apparition du spectre est suivie par spectroscopie à la température ordinaire, avant de plonger la cuve dans l'azote liquide.

L'hydrosulfite de sodium est ajouté en solution à la concentration finale de 10^{-3}M aux fractions particulaires, 90 secondes avant l'immersion dans l'azote liquide.

La concentration des différents substrats réducteurs utilisés ainsi que la durée d'incubation des préparations en présence de ces substrats à la température ordinaire varient suivant les préparations. Nous avons vérifié que le spectre ne se modifie pas, même si la durée d'incubation est prolongée jusqu'à 20 minutes.

Sans addition d'agent réducteur, même après 20 minutes d'incubation à l'abri de l'air, le spectre cytochromique des différentes fractions n'apparaît pas. Ces fractions ne contiennent donc plus de substrats susceptibles de réduire les cytochromes en anaérobiose. Nous verrons d'ailleurs au Chapitre suivant, que la respiration endogène de la fraction mitochondriale A_1 est très faible ou même nulle.

A - Cas de la levure cultivée en aérobiose.

1- Fractionnement dans le PVP 7,5 %.

L'aspect morphologique des fractions a été exposé au chapitre précédent.

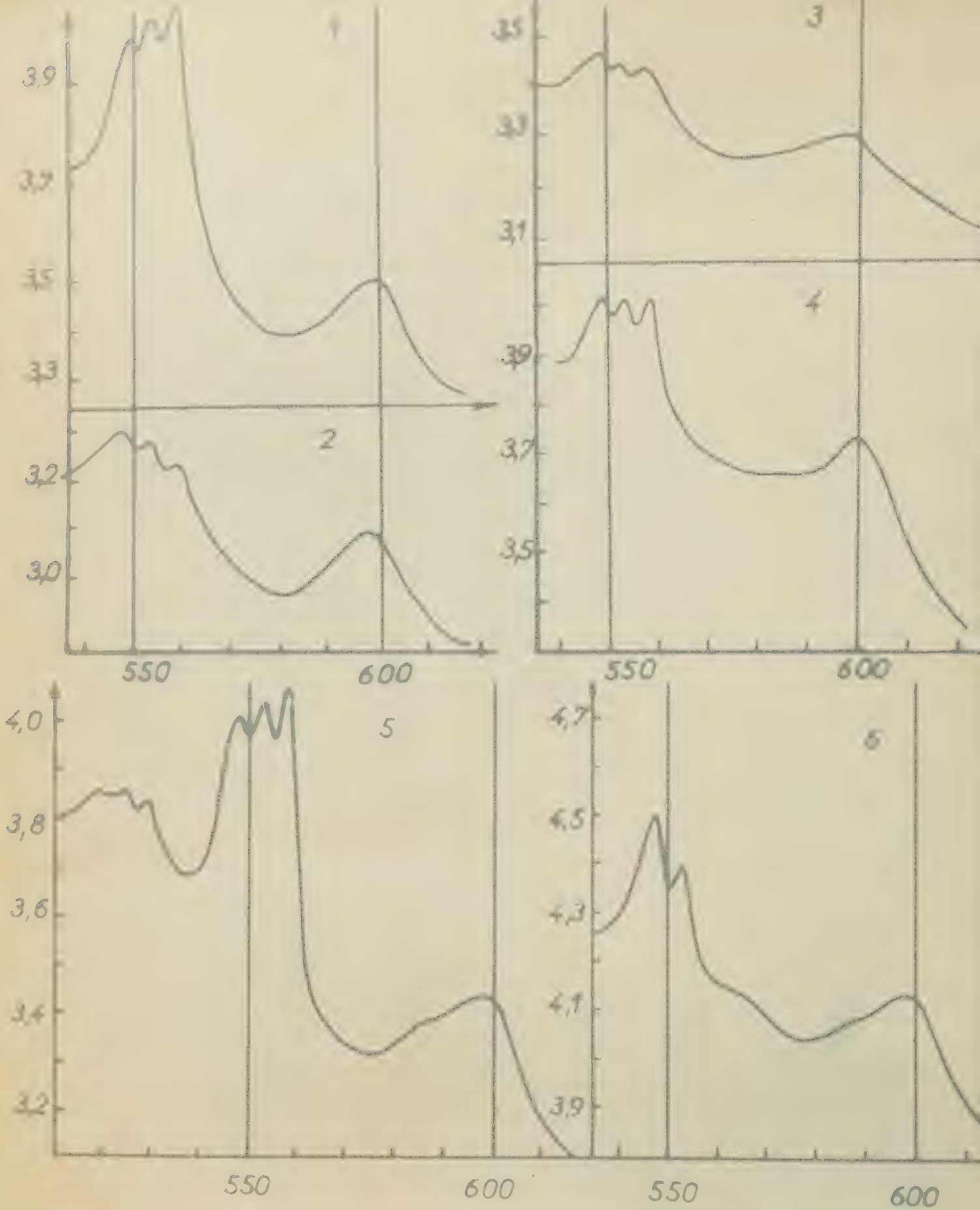


Figure 17: Spectres de la fraction A_1 isolée dans le PVP. Exp. 1, courbes 1,2,3,4; exp. 2, courbes 5,6. 1,2,4,5,6 e = 0,6 mm; 3 e = 1,5 mm.
Réduction par 1)et 5) $Na_2S_2O_4$ 2)succinate; 3) DPNH;4)DL-lactate;6)ascorbate.

Fraction A_1:

- Réduction par l'hydrosulfite de sodium (figure 17, courbes 1 et 5).

Le spectre est très intense car les cytochromes sont beaucoup plus concentrés dans cette fraction que dans les cellules entières. Il devient possible de déterminer non seulement la position des bandes α, mais aussi celle des bandes β:

cα	= 547 mμ	cβ	= 519 mμ
c_1α	= 552,5-553 mμ	c_1β	= 525 mμ
bα	= 558 mμ	bβ	= 529 mμ
(a+a_3)α	= 598-600 mμ	les cytochromes a et a_3 ne possèdent pas de bande β.	

La bande cα est relativement moins intense que dans le spectre de la cellule entière réduite par l'hydrosulfite.

- Réduction par le succinate de sodium 10^{-3}M; incubation 10 minutes: (figure 17, courbe 2)

Contrairement au spectre précédent, la bande α du cytochrome c est légèrement plus intense par rapport aux autres bandes d'absorption que dans le spectre des cellules entières dont les pigments sont réduits par les substrats endogènes ou par l'hydrosulfite.

- Réduction par DPNH 10^{-3}M; incubation 10 minutes (figure 17, courbe 3):

Ce spectre est à peu près identique à celui obtenu après réduction par le succinate.

- Réduction par le DL-lactate d'ammonium 10^{-3}M; incubation 10 minutes (figure 17, courbe 4)

Les bandes situées à 552,5 et 558 mμ sont plus accentuées par rapport à celle du cytochrome c que dans le cas de la réduction par le succinate et par DPNH. Ceci peut s'expliquer par le fait que le lactate réduit le cytochrome b_2, ou lacticodéshydrogénase, en plus des cytochromes c_1 et b dont les bandes d'absorption sont situées aux mêmes longueurs d'onde que le cytochrome b_2. En effet, comme nous le verrons plus loin, la concentration dans cette fraction de la lacticodéshydrogénase est suffisante pour expliquer cette intensification.

- Réduction par l'ascorbate de sodium 10^{-2}M; incubation 5 minutes (figure 17, courbe 6):

On observe les bandes des cytochromes c, c_1 et a + a_3. La bande cα est relativement beaucoup plus intense par rapport à la bande c_1α que par réduction par l'hydrosulfite. L'ascorbate ne réduit dans ces conditions ni le cytochrome b, ni le cytochrome b_2 car on n'observe pas d'absorption à 558 mμ. La faible bande observée vers 565 mμ peut correspondre à l'état oxydé d'un cytochrome de type b.

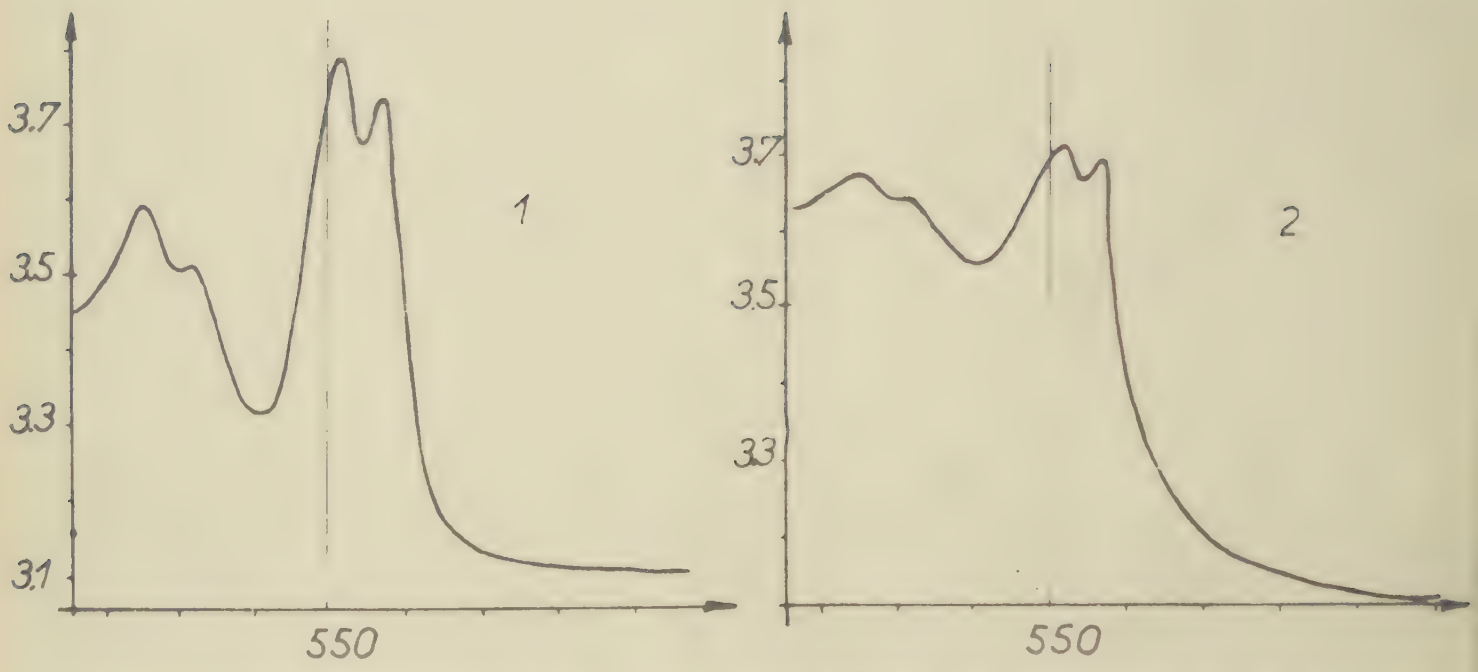


Figure 18: Spectres des fractions A_2 et A_2 isolées dans le PVP. Réduction par $Na_2S_2O_4$ - e =

Fraction A_2:

Le plus souvent, le spectre à l'état réduit des préparations de cette fraction présente seulement deux bandes α intenses, situées à 551,5 mμ et à 557,5 mμ, et deux bandes β situées à 525 mμ et à 532 mμ (figure 18, courbe 1). Ce spectre est réductible par l'hydrosulfite, par DPNH et par TPNH, mais non par le succinate, le lactate et l'ascorbate. Certaines préparations présentent de plus une faible bande cα et une faible bande $(a + a_3)\alpha$ qui apparaissent dans ce cas par réduction par le succinate, par le lactate et par l'ascorbate. En effet, la fraction A_2 est une fraction intermédiaire et suivant sa teneur en mitochondries et en débris mitochondriaux, elle contient plus ou moins de cytochromes c et $a + a_3$.

Fraction A_3:

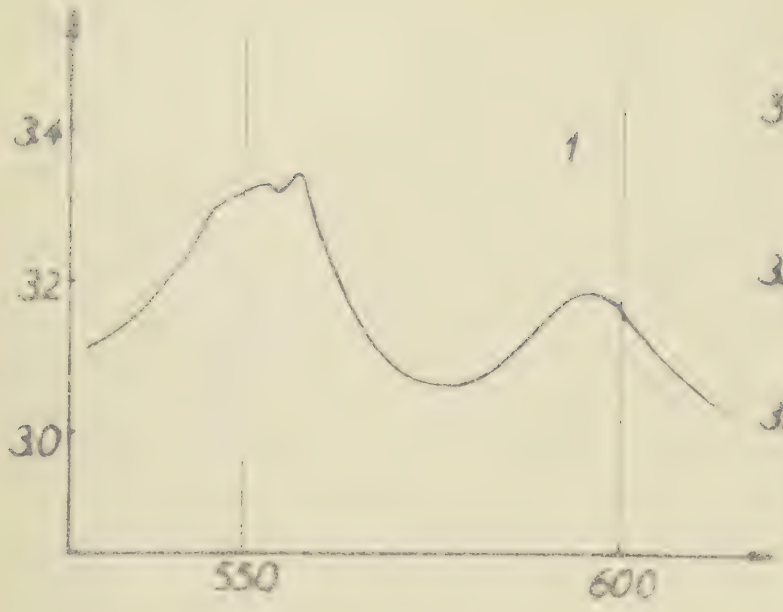
Le spectre de cette fraction réduit par l'hydrosulfite (figure 18, courbe 2 par DPNH et par TPNH, présente uniquement deux bandes α situées à 551,5 mμ et à 557,5 mμ. Ces bandes sont moins intenses que dans la fraction A_2 pour une préparation de même épaisseur. Ce spectre n'est réductible ni par le succinate, ni par le lactate, ni par l'ascorbate. On n'observe pas dans cette fraction les bandes correspondant aux cytochromes c et $a + a_3$.

Surnageant de la fraction A_3:

Par examen spectroscopique à la température ordinaire, du surnageant réduit et placé dans une cuve à faces parallèles, d'une épaisseur de 6 cm, on ne décèle aucune bande d'absorption. A la température de l'azote liquide, il aurait fallu utiliser une épaisseur de 1 cm pour avoir la même résolution; or, dans ces conditions, aucune observation n'est possible à cause de la perte de lumière due aux réflexions multiples provoquées par la cristallisation.

2- Fractionnement dans le lactose 0,5 M ou dans le tampon phosphate 0,067 M, pH 6,8.

Les spectres des fractions sont les mêmes que ces fractions soient préparées dans le lactose 0,5 M ou dans le tampon phosphate 0,067 M, pH 6,8 au lieu du PVP. La réduction des pigments est effectuée par l'hydrosulfite de sodium. La fraction mitochondriale A_1 possède un spectre dont la bande cα est très faible (figure 19, courbe 1); celle-ci est légèrement plus intense dans le spectre de la fraction A_2.



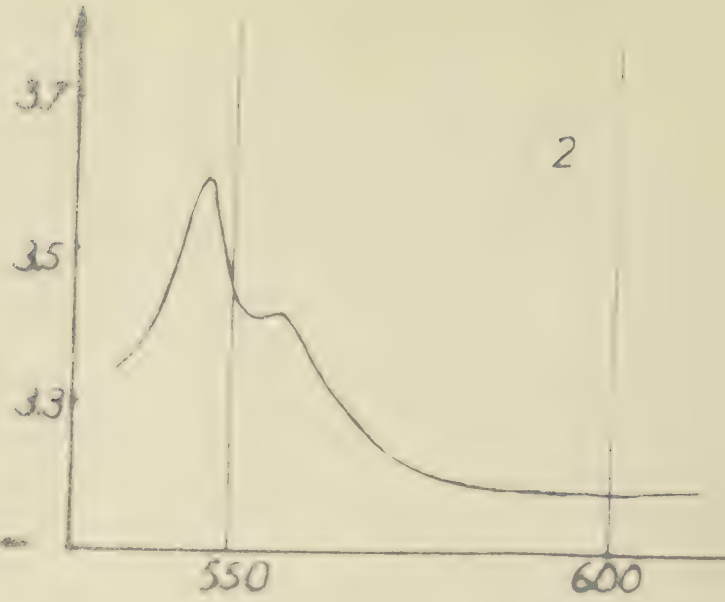
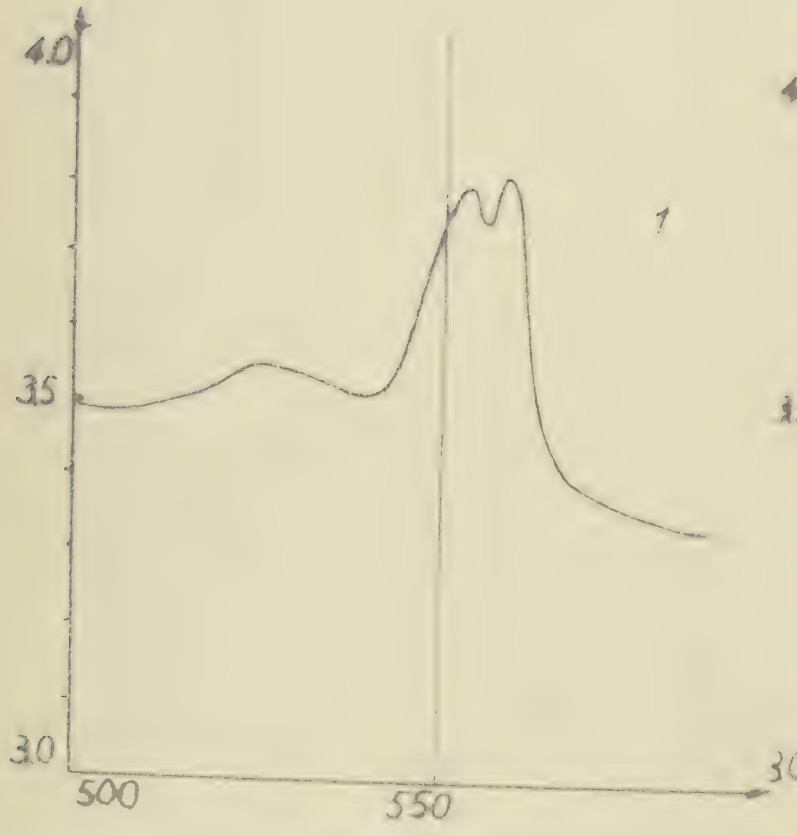


Figure 19: Spectres des fractions A_1 et A_3 isolées dans le tampon phosphate. Réduction par $Na_2S_2O_4$ - e = 0,8 mm.



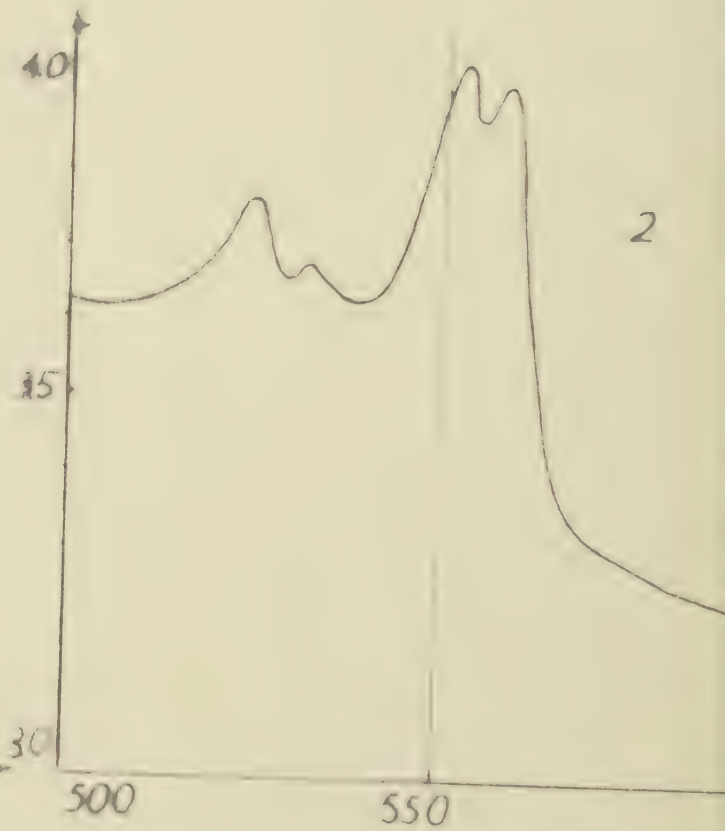


Figure 20: Spectres des fractions N_1 et N_2 e = 0,5 mm. Réduction par $Na_2S_2O_4$.

Le spectre de la fraction A_3 (figure 19, courbe 2) présente une bande cα intense et une bande faible vers 558 mμ. La présence de cytochrome c n'a pu être décelée dans le liquide surnageant final du fractionnement. La fraction A_3, remise en suspension dans le tampon phosphate ou dans ClNa 0,5 M, homogénéisé au broyeur de Potter, puis centrifugée 30 minutes à 105.000 g, possède toujours le cytochrome c. Celui-ci ne semble donc pas être une substance adsorbée sur les particules, mais une substance entrant dans la constitution de certaines de ces particules.

B - Cas de la levure cultivée en anaérobiose.

L'aspect morphologique des fractions isolées dans le PVP 7,5 % a été décrit au chapitre précédent.

1- Réduction du cytochrome b_1 :

Toutes les fractions particulaires, réduites par l'hydrosulfite de sodium, ont un spectre identique à celui des cellules entières réduites par le même agent: bandes α à 552,5 mμ et à 558 mμ, bandes β à 525 mμ et à 532,5 mμ (figure 20). Le spectre de la fraction N_1 est moins intense que celui de la fraction N_2.

DPNH ou TPNH 10^{-3}M après 10 minutes d'incubation réduisent le cytochrome b_1; le système enzymatique responsable de ces réductions est très sensible à la dénaturation par la chaleur.

Le cytochrome b_1 est également réduit par l'ascorbate de sodium 10^{-2}M, après 10 minutes d'incubation et il est partiellement réduit par la cystéine 2.10^{-2}M après 17 minutes d'incubation.

Dans l'homogénat, le cytochrome b_1 n'est réduit ni par le glucose-6-phosphate ni par le β-hydroxy-butyrate, ni par le malate, ni par le lactate, ni par le succinate. Tous ces essais ont été réalisés avec des préparations sur lesquelles il avait été vérifié au préalable que le cytochrome b_1 était réductible par DPNH et ne s'était donc pas inactivé.

2- Essais d'inhibition de la réduction du cytochrome b_1 :

a) Par la quinacrine (3-chloro-7-méthoxy-9-(1-méthyl-4-diéthylaminobutyl-amino)-acridine)

Comme la quinacrine ou atabrine est considérée comme inhibiteur des flavines, nous

avons essayé à l'aide de cet inhibiteur d'examiner si la réduction du cytochrome b_1 était sous la dépendance d'un enzyme flavinique*. Le résultat a été que, même à la concentration de 10^{-3}M, la quinacrine ajoutée 5 minutes avant l'addition du DPNH n'inhibe pas la réaction. A titre de comparaison, nous avons alors essayé l'action de la quinacrine sur la réduction par DPNH du cytochrome b_5 d'une préparation de microsomes de foie de rat, contenant d'une façon certaine une DPNH-cytochrome b_5-réductase de nature flavinique et nous n'avons pas obtenu non plus d'inhibition pour une concentration de quinacrine de 10^{-3}M.

b) Par le para-chloromercuribenzoate de sodium (PCMB):

Nous avons également essayé l'inhibition de la réduction par DPNH du cytochrome b_1 par le PCMB inhibiteur des groupements -SH. Aucune inhibition n'a été observée avec une solution de PCMB de sodium 4.10^{-3}M dans le tampon glycyl-glycine ajoutée 5 minutes avant l'addition de DPNH. Il convient de remarquer que l'enzyme flavinique intervenant dans la réduction du cytochrome b_5 par DPNH contient des groupements -SH actifs et que cet enzyme n'est pas inhibé par le PCMB 10^{-3}M quand le système enzymatique est constitué par des microsomes bruts alors qu'il est inhibé quand le système enzymatique est constitué par le mélange de cytochrome b_5 et de réductase purifiée **. Ceci peut s'expliquer par le fait que les molécules de PCMB, comme celles sans doute de quinacrine, ne peuvent atteindre l'enzyme dans les particules subcellulaires de cellules hépatiques. Il est possible qu'il en soit de même dans le cas des particules des levures.

II - ETUDE DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE L'ACTIVITE LACTICODESHYDROGENASE.

On sait que la levure cultivée en aérobiose possède une lacticodéshydrogénase spécifique du L-lactate, tandis que la levure cultivée en anaérobiose possède un enzyme spécifique du D-lactate (139, 75); l'enzyme aérobie ou cytochrome b_2 réduit le cytochrome c et le ferricyanure de potassium, tandis que l'enzyme anaérobie

* D'après Hemeker et Hülsmann(138), l'atabrine inhiberait aussi les enzymes non flaviniques; selon ces auteurs, la levée de l'inhibition des enzymes flaviniques par addition de flavine mononucléotide serait due à la formation d'un composé entre ce corps et l'atabrine.

** Les essais d'inhibition de la réduction du cytochrome b_5 ont été effectués en collaboration avec R. Poltoratsky.

ne réduit que le ferricyanure. Lors de l'adaptation respiratoire par l'oxygène des levures cultivées en anaérobiose, l'activité D-lactate-ferricyanure-réductase disparaît en même temps qu'apparaît l'activité L-lactate cytochrome c ou ferricyanure réductase (139).

Nous avons mesuré l'activité lacticodéshydrogénase dans les fractions de levures récoltées en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie par la vitesse de réduction du ferricyanure en présence de DL-lactate. Ces dosages ont été faits avant de connaître les résultats de Nygaard (140), d'après lesquels il y a chez les levures cultivées en aérobiose non seulement un enzyme spécifique du L-lactate, mais aussi un enzyme spécifique du L-lactate capable de réduire le cytochrome c et non le ferricyanure. De plus, un autolysat de levure cultivée en aérobiose présente, d'après Slonimski et Tysarowski (139) une activité D-lacticoferricyanure réductase égale à 3 µmoles de ferricyanure réduites/heure/mg protéine; cette activité est égale à 30 dans le cas d'un autolysat de levure cultivée en anaérobiose.

A - Activité lacticodéshydrogénase des fractions isolées à partir de la levure cultivée en aérobiose.

Comme le montre le Tableau XI, l'activité est localisée dans les fractions particulaires et principalement dans la fraction mitochondriale. Il est possible, d'après les résultats de Slonimski et Tysarowski, qu'une partie de cette activité soit due à l'enzyme D-lacticoferricyanure réductase (bien que d'après nos propres résultats en ce qui concerne la levure cultivée en anaérobiose et ceux de Somlo (141) en ce qui concerne la levure cultivée en aérobiose ou en anaérobiose, cette activité soit surtout localisée dans la fraction soluble).

La fraction soluble, obtenue dans nos conditions expérimentales, est dépourvue d'activité. Or, d'après Somlo (142), la fraction particulaire (obtenue par broyage mécanique des cellules) d'un homogénat de levure récoltée en phase stationnaire de croissance aérobie sur milieu glucosé, contient seulement 18% environ de l'activité totale L-lacticoferricyanure réductase, le reste étant retrouvé dans le surnageant. L'activité spécifique de l'homogénat est voisine de 10 µmoles de ferricyanure réduites par heure/mg protéine. Il est possible de faire à ce propos les hypothèses suivantes:

Activité lacticodéshydrogénase (mesurée en présence de DL-lactate et de ferricyanure de potassium de fractions subcellulaires de levures.

Les fractions ont été obtenues selon les conditions décrites dans la légende du Tableau X.

Tableau XI: Levures cultivées en aérobiose.

Fractions	Force centrifuge g.10^3	Protéines		Activité		
		mg	% de l'homogénat	Unités totales	% de l'homogénat	Activité spécifique
-Exp. I						
Homogénat (suspension S)		550	100	980	100	1,78
Fraction 1	1-8 (30 min.)	104	19,0	910	93	8,75
Fraction 2	8-105 (90 min.)	269	48,8	0	0	0
-Exp. II						
Homogénat (suspension S)		326	100	490	100	1,50
Fraction 1 (A_1)	1-4 (30 min.)	53,5	16,4	325	66,5	6,10
Fraction (A_2+A_3)	4-105 (90 min.)	84	28,0	124	25,4	1,48

Tableau XII: Levures cultivées en anaérobiose.

Fractions	Protéines		Activité		
	mg	% de l'homogénat	Unités totales	% de l'homogénat	Activité spécifique
Homogénat (suspension S)	218	100	1.120	100	5,15
N_1	31	14,2	285	25,4	9,20
N_2	61	28	161	14,4	2,65
N_3	56	27,5	98,5	8,8	1,76
Surnageant de N_3	68	31,2	549	49	8,07

1- l'enzyme de la fraction soluble serait inactivé dans nos préparations. L'activité spécifique de l'homogénat que nous obtenons est en effet beaucoup plus faible que celle de l'homogénat obtenu par Somlo; ce fait peut cependant être expliqué grâce aux résultats obtenus par Galzy et Slonimski (143) qui montrent que l'activité lacticodéshydrogénase(mesurée en présence de DL-lactate et de cytochrome c) est quatre fois plus faible en phase exponentielle qu'en phase de ralentissement de la croissance sur milieu glucosé.

2- en phase stationnaire comme en phase exponentielle de croissance l'enzyme (L-lactate) serait lié,dans la cellule intacte,à la fraction particulaire; cependant, dans le cas des fractionnements de levure de phase stationnaire réalisés par Somlo, l'activité spécifique est généralement plus élevée dans le surnageant que dans les particules ce qui, ainsi que le fait remarquer cet auteur (142), n'est pas en faveur d'une situation initiale purement mitochondriale.

3- la distribution intracellulaire de l'activité L-lacticodéshydrogénase serait différente en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Cette hypothèse semble, pour l'instant, la plus vraisemblable.

B - Activité lacticodéshydrogénase des fractions isolées à partir de la levure cultivée en anaérobiose.

Dans le cas de l'expérience dont les résultats sont donnés dans le Tableau XII, 49% de l'activité sont retrouvés dans la fraction soluble. Dans le cas d'autres fractionnements pour lesquels nous avons aussi déterminé la distribution de l'activité lacticodéshydrogénase sans mesurer l'activité spécifique, nous avons retrouvé jusqu'à 80% de cette activité dans la fraction soluble. Ici aussi, l'activité spécifique que nous avons mesurée est beaucoup plus faible que celle qui a été mesurée par Slonimski et Tysarowski (139) dans le cas d'un autolysat de levure et qui est égale à 30. Mais il est difficile de comparer ces différents résultats étant donné d'une part que les levures n'ont pas été récoltées pendant la même phase de croissance, et d'autre part que l'activité spécifique d'un autolysat peut être beaucoup plus élevée que celle d'un homogénat.

DISCUSSION.

Nous envisagerons successivement le cas des cytochromes de la levure cultivée en aérobiose et celui des cytochromes de la levure cultivée en anaérobiose. A titre de comparaison, nous avons rassemblé sur le Tableau XIII les résultats concernant l'action des différents agents réducteurs sur les spectres cytochromiques des fractions de cellules de levure, sur le spectre du cytochrome b_2 purifié (L-lacticodéshydrogénase) et sur le spectre du cytochrome b_5 dans les microsomes de la cellule hépatique.

A - Cas de la levure cultivée en aérobiose.

1- Localisation intracellulaire du cytochrome c.

La répartition différente du cytochrome c dans le cas du fractionnement dans le PVP et dans le cas du fractionnement dans le lactose ou le tampon phosphate met en évidence l'importance du rôle de la technique de fractionnement dans l'étude de la distribution intracellulaire des enzymes. L'examen au microscope électronique et l'examen spectrographique constituent ici deux méthodes très sensibles pour déterminer la pureté et le degré d'intégrité des fractions mitochondriales isolées.

Les mitochondries isolées dans le tampon phosphate par Chance et Nossal (24) par centrifugation de l'homogénat obtenu à 15.000 g après désintégration mécanique des cellules, présentent à la température ordinaire un spectre comportant les bandes d'absorption des cytochromes ($a + a_3$), b et c_1 et non celles du cytochrome c. Nos résultats montrent que:

1) les mitochondries isolées dans le PVP contiennent la presque totalité du cytochrome c.
2) dans le cas de fractionnement dans le lactose ou dans le tampon phosphate, le cytochrome c sédimente principalement avec la fraction microsomique; il n'est pas décelable dans la fraction soluble, vraisemblablement à cause de sa trop faible concentration.

Un phénomène analogue a été observé dans le cas des tumeurs d'hépatome ascitique (145): les mitochondries de ces cellules semblent extrêmement fragiles, une

Tableau XIII: Action de quelques agents réducteurs sur le spectre (bandes α) des cytochromes de fractions subcellulaires de levures récoltées en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie, du cytochrome b_2 purifié (L-lacticodéshydrogénase), du cytochrome b_5 *in situ*.

Source	Cytochromes	mμ -190°	REDUCTION					
			$S_2O_4Na_2$	DPNH	TPNH	DL-lactate	Succinate	Ascorbate
Mitochondries de levures aérobies (A_1)	$a + a_3$	600	+	+		+	+	+
	b	558	+	+		+	+	0
	c_1	552-553	+	+		+	+	+
	c	547-548	+	+		+	+	+
Fractions A_2 et A_3		557,5	+	+	+	0	0	0
Levures aérobies		551,5	+	+	+	0	0	0
Levures aérobies	b_2	557,5*	+	0**	0***	+		
		552,5	+	0	0	+		
Levures anaérobies	b_1	558	+	+	+	0	0	+
		552,5	+	+	+	0	0	+
Microsomes de cellules hépatiques de porc	b_5	558	+	+	+	0	0	0
		552	+	+	+	0	0	0

* (30)

** (28)

*** (144)

grande partie de leur cytochrome c sédimente sous forme particulaire à 105.000 g (sans être accompagné non plus, comme dans le cas de la levure, des cytochromes a et a_3).

Il est possible que le cytochrome c soit associé dans les mitochondries de levures de phase exponentielle de croissance de la même façon que dans les mitochondries de cellules de mammifères: en effet, dans ce cas, le cytochrome c se trouve, d'après Crane et coll. (146, 147), sous la forme d'un complexe lipoprotéique (insoluble dans l'eau) dont la portion chromoprotéique (soluble dans l'eau) serait facilement dissociable.

2- Réduction des cytochromes mitochondriaux par l'hydrosulfite, le succinate et DPNH.

La fraction A_1 présente à peu près le même spectre après réduction des pigments par le succinate ou par DPNH. Les cytochromes semblent donc être réduits dans les mêmes proportions par ces deux substrats.

L'hydrosulfite provoque dans le spectre de la fraction A_1 une forte accentuation relative des bandes α situées à 552 mμ et à 558 mμ. Il convient de comparer ce spectre d'une part à celui des cellules entières en présence d'hydrosulfite, d'autre part à celui de la fraction A_1 en présence des autres agents réducteurs utilisés:

1) dans le spectre des cellules entières, les proportions relatives des cytochromes c, c_1 et b semblent être les mêmes en présence ou en absence d'hydrosulfite. Il est donc probable qu'une partie des mitochondries de la fraction A_1 a perdu du cytochrome c. Dans certaines préparations en effet, la fraction A_2 présente une faible bande α: ce cytochrome c peut être apporté soit par des débris de mitochondries, soit par de petites mitochondries sédimentant avec cette fraction. La fraction soluble ne présente pas de bande due au cytochrome c, mais il est possible que ce pigment y soit en trop faible concentration pour être décelé par spectroscopie.

2) les bandes α de la fraction A_1 situées à 552 mμ et à 558 mμ sont beaucoup plus intenses par rapport à celles du cytochrome c par réduction par l'hydrosulfite que par réduction par le succinate, par le lactate ou par DPNH. De même, la réduction de la bande α située à 552 mμ est beaucoup plus intense par rapport à celle du cytochrome c par réduction par l'hydrosulfite que par réduction par l'ascorbate.

L'absorption due au cytochrome b_2 ne peut suffire à provoquer cette intensification ainsi que le montre l'aspect des spectres après réduction par l'hydrosulfite ou par le DL-lactate.

Cette intensification ne semble pas pouvoir s'expliquer non plus par une dénaturation du cytochrome c provoquée par l'hydrosulfite. En effet, la différence Δ (550 mμ - 620 mμ) est à peu près la même en présence de DL-lactate ou d'hydrosulfite (figure 17, courbes 4 et 5). Cette différence est beaucoup plus faible en présence de succinate ou de DPNH ce qui laisse supposer que dans ce cas la réduction du cytochrome c n'est pas complète.

Il est donc possible que dans la fraction A_1 l'hydrosulfite réduise un pigment supplémentaire comme dans le cas des préparations de muscle cardiaque étudiées par Chance (16); dans le spectre de ces préparations, l'hydrosulfite produit également une accentuation relative des bandes α situées dans cette région.

3- Réduction des cytochromes mitochondriaux par l'ascorbate.

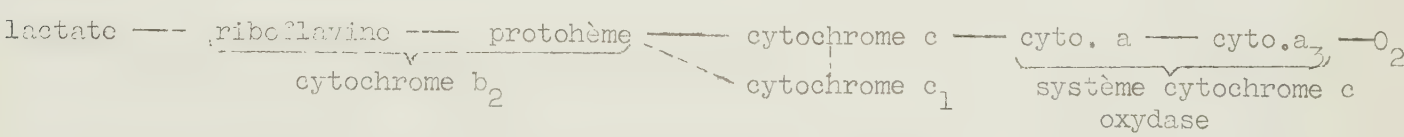
Dans nos conditions (à pH 6,8), l'ascorbate ne réduit pas de cytochrome de type b. Ce résultat est en accord avec celui de Chance qui observe que l'ascorbate réduit tous les cytochromes d'une préparation de cellules de muscle cardiaque sauf le cytochrome b (148). D'après Slater, le fait que l'ascorbate ne réduise pas le cytochrome b, serait dû non à des raisons de thermodynamique mais à des raisons de cinétique.(149). Cet auteur a observé en effet, une faible bande bα, 30 minutes après l'addition d'ascorbate, à une préparation de muscle cardiaque (à l'abri de l'air) (150). Dans le cas de nos préparations, la bande bα n'apparaît pas en présence d'ascorbate même après 20 minutes d'incubation à l'abri de l'air.

4- Localisation du cytochrome b_2; réduction des cytochromes mitochondriaux par le DL-lactate.

Quand la fraction mitochondriale A_1 est placée en présence de DL-lactate, les bandes d'absorption à 552 et 558 mμ s'accentuent davantage qu'en présence de succinate ou de DPNH. Cette intensification peut s'expliquer par la réduction supplémentaire du cytochrome b_2 absorbant dans cette région du spectre. Puisque l'activité lacticodéshydrogénase est principalement localisée dans A_1, il est possible de calculer si sa concentration est suffisante pour provoquer une absorption supplémentaire

décelable par notre méthode de la façon suivante:
- d'après Appleby et Morton (151), une mole de lacticodéshydrogénase (cytochrome b_2) réduit par minute 10.350 moles de ferricyanure. Comme la fraction A_1 peut réduire 8 µmoles de ferricyanure par heure et par mg de protéines, elle contient environ $1,3.10^{-11}$ moles de cytochrome b_2 par mg de protéines. Pour apprécier si le cytochrome b_2 se trouve dans la fraction A_1 à une concentration pouvant influencer le spectre, on peut comparer la concentration du cytochrome b_2 à la concentration du cytochrome c. D'après Yeas et Drabkin (82) il y aurait 10 à 20 µg de cytochrome c par gramme (poids frais) de levure de boulangerie commerciale, soit environ 100 µg de cytochrome c pour 1 gramme poids sec ou pour 0,50 g de protéine. Cette concentration a été déterminée d'après la méthode décrite page 43 . D'après les courbes de la figure 8, nous pouvons dire que la concentration en cytochrome c de la levure Yeast Foam récoltée en phase exponentielle de croissance est au maximum égale à la moitié de la concentration en cytochrome c de la levure de boulangerie commerciale. La fraction A_1, correspondant environ à 20% des protéines totales de l'homogénat, contient tout le cytochrome c des cellules, donc 1 mg de protéine de cette fraction contient environ 0,5 µg de cytochrome c, soit $3,8.10^{-11}$ moles de cytochrome c par mg de protéine A_1. Le coefficient d'extinction millimolaire (ε mM) de la bande α du cytochrome c étant égal à 27,8, et celui de la bande α du cytochrome b_2 à 38,8 (152), ε mM cytochrome b_2/ ε mM cytochrome c = 1,4. Donc, pour être comparée à la concentration du cytochrome c, la concentration du cytochrome b_2 doit être multipliée par 1,4, soit, $1,3.10^{-11}$ x 1,4 = $1,8.10^{-11}$ moles. Cette concentration semble donc tout à fait suffisante pour provoquer une augmentation de la densité optique de A_1 dans la région du spectre où absorbe le cytochrome b_2.

S'appuyant entre autre, sur nos résultats concernant la localisation dans les mitochondries de l'activité lacticodéshydrogénase chez la levure aérobie, Morton et Armstrong (153) suggèrent que l'oxydation du L-lactate par les mitochondries de levure se fait suivant le schéma ci-dessous:



Il faut ajouter que, d'après nos résultats spectrographiques, le cytochrome b est également réduit dans les mitochondries par addition de DL-lactate.

5- Cytochromes des fractions A_2 et A_3 .

Le spectre réduit des fractions A_2 et A_3 obtenues dans le PVP 7,5 % possède deux bandes α intenses situées à 551,5 mμ et à 557,5 mμ. La bande à 551,5 mμ ne correspond pas au cytochrome c_1 absorbant à peu près à la même longueur d'onde car elle n'apparaît pas par réduction par l'ascorbate. De plus, les bandes 551,5 mμ et 557,5 mμ ne correspondent ni aux cytochromes c_1 et b car elles n'apparaissent pas par réduction par le succinate, ni au cytochrome b_2 car elles n'apparaissent pas par réduction par le DL-lactate. Les systèmes enzymatiques succino-cytochrome c-réductase et lactico-cytochrome c-réductase ne sont cependant pas inactivés dans cette fraction puisque, dans certaines préparations de cette fraction, des bandes peu intenses correspondant aux cytochromes c et a + a apparaissent en présence de succinate et de DL-lactate. Notons également que les 3 bandes β du spectre de la fraction A_2 sont situées à 585 mμ et à 532 mμ alors que la bande β du cytochrome b (dans le spectre de la fraction A_1 en présence d'hydrosulfite) est située à 529 mμ.

Enfin, le spectre de la fraction A_2 ne correspond pas non plus au cytochrome b_1 car ce dernier est réductible par l'ascorbate.

La fraction A_2 est très riche en éléments du reticulum endoplasmique, membranes et ribosomes associés. La fraction A_3 dont le spectre est identique à celui de la fraction A_2 mais un peu moins intense est composé presque exclusivement de ribosomes. Il apparaît donc que A_2 et A_3 contiennent un pigment hématinique homologue du cytochrome b_5 microsomique des cellules hépatiques et qui présente également deux bandes d'absorption α et deux bandes d'absorption β à -190° (154, 155). Comme le cytochrome b_5 *in situ*, le composé hématinique de la fraction A_2, réductible par DPNH et par TPNH, n'est réductible ni par l'ascorbate, ni par les autres substrats de la chaîne respiratoire; c'est aussi le cas du cytochrome b_3 des microsomes de certaines cellules végétales (156).

B - Cas de la levure cultivée en anaérobiose.

1- Localisation intracellulaire du cytochrome b_1.

D'après nos résultats le cytochrome b_1 est principalement concentré dans la fraction N_2. Il convient donc de supposer que ce pigment est localisé soit dans

des particules autres que les "mitochondries", soit dans une variété de "mitochondries" particulièrement fragiles dont les débris seraient abondants dans cette fraction. Il n'est cependant pas possible d'identifier de tels débris par l'examen au microscope électronique. Cet examen révèle en effet que la fraction N_2 (comme la fraction A_2) est principalement composée de ribosomes associés à des éléments membraneux, éléments que l'on retrouve en proportions notables dans la fraction N_1 tandis que la fraction N_3 est composée presque exclusivement de ribosomes libres. La répartition du cytochrome b_1 semble être la même que celle de ces éléments membraneux.

2- Localisation intracellulaire de l'activité lacticodéshydrogénase.

Une des raisons qui nous a incités à rechercher la répartition de l'activité lacticodéshydrogénase dans les cellules de levures cultivées en anaérobiose était de savoir si le cytochrome b_1 dont les bandes d'absorption occupent les mêmes positions que celles du cytochrome b_2 pouvait être identifié à celui-ci. De plus, au moment où Slonimski et Tysarowski (139) émettaient l'hypothèse d'une conversion possible de l'enzyme anaérobie spécifique du D-lactate en un enzyme aérobie spécifique du L-lactate lors de l'adaptation des cellules anaérobies en présence d'oxygène, il paraissait intéressant de comparer la localisation des activités lacticodéshydrogénases de la levure cultivée en anaérobiose et de la levure cultivée en aérobiose.

Nos résultats permettent d'exclure que le cytochrome b_1 soit associé à une activité lacticodéshydrogénase puisque d'une part, il n'est pas réductible par le DL-lactate et que, d'autre part, la répartition de l'activité lacticodéshydrogénase ne correspond pas à la répartition du cytochrome b_1. En effet, 50 à 80% de cette activité sont concentrés dans le liquide surnageant de l'homogénat centrifugé à 105.000 g et le reste est retrouvé dans les fractions particulaires. Il est possible que l'enzyme existe dans la cellule sous forme liée et sous forme soluble.

De plus, d'après des résultats récents d'Iwatsubo et Labeyrie (157), l'enzyme D-lactidodéshydrogénase de la levure cultivée en anaérobiose ne possède pas de groupement hématinique.

CONCLUSION.

L'étude d'une part de la répartition intracellulaire des cytochromes et de leur mode de réduction, d'autre part de la répartition intracellulaire de l'activité lacticodéshydrogénase chez la levure récoltée en phase exponentielle de croissance aérobie ou anaérobie nous a permis d'établir les résultats suivants:

1- le cytochrome c semble entièrement mitochondrial. Lors du fractionnement des cellules réalisé dans un milieu (lactose 0,5 M ou tampon phosphate 0,067 M) altérant la structure des mitochondries, il s'en détache et sédimente en très grande partie sous forme particulaire. Ainsi, comme dans le cas du cytochrome c des cellules de mammifères, il existe essentiellement sous "forme liée";

2- la répartition des cytochromes de la levure cultivée en aérobiose semble être identique à celle des cytochromes des cellules de mammifères. Les cytochromes de la chaîne respiratoire classique sont localisés dans les mitochondries. La fraction de type microsomique et plus spécialement les éléments membraneux de cette fraction, possèdent un pigment analogue au cytochrome b_5 des microsomes des cellules hépatiques en ce qui concerne la position des bandes d'absorption et le mode de réduction du spectre ou au cytochrome b_3 des microsomes de certaines cellules végétales.

3- le cytochrome b_2 (L-lacticodéshydrogénase) est localisé dans les mitochondries ainsi que le montrent les résultats du dosage de l'activité lacticodéshydrogénase. En présence de DL-lactate, la réduction du cytochrome b_2 provoque une accentuation du spectre à 552 et 558 mμ (à -190°) des mitochondries. Tous les cytochromes de la chaîne respiratoire sont réduits par le lactate.

4- le cytochrome b_1 (α = 552,5 mμ et α = 558 mμ) de la levure cultivée en anaérobiose est principalement localisé dans une fraction riche en éléments de type microsomique mais ne semble pas associé aux ribosomes du réticulum endoplasmique. Le cytochrome b_1 est réductible par TPNH, DPNH et par l'ascorbate. Il n'est pas présent chez les levures cultivées en aérobiose car aucune fraction subcellulaire de ces levures ne présente de cytochrome absorbant à 558 mμ, réductible par l'ascorbate.

C H A P I T R E III

ETUDE DE L'APTITUDE RESPIRATOIRE DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES

Dans le but de rechercher si, en présence d'oxygène, un broyat de levures cultivées en anaérobiose ou une fraction particulaire de ces levures étaient capables de réaliser la synthèse des enzymes respiratoires de la même façon que les cellules entières récoltées au cours de leur croissance anaérobie, nous avons réalisé la série d'expériences suivantes:

1) tout d'abord, nous avons déterminé la capacité d'adaptation respiratoire de cellules entières cultivées en anaérobiose, récoltées dans les conditions décrites page 18. Cette détermination a été faite par des mesures manométriques de consommation d'oxygène (107).

2) nous avons ensuite fait les mêmes mesures sur un matériel qui n'est plus la cellule entière, mais qui a cependant conservé la structure interne, les protoplastes, obtenus par digestion de la paroi cellulaire par le SHP.

3) nous nous sommes enfin adressés au matériel particulaire. Nous avons d'abord mis au point les conditions dans lesquelles les mitochondries de levures aérobies respirent à une vitesse maximum. Ensuite, ayant ajouté en particulier, à l'homogénat de levures cultivées en anaérobiose, les différents constituants du milieu de respiration des mitochondries aérobies, nous avons d'une part, examiné après différentes durées d'aération le spectre de l'homogénat, et d'autre part recherché si cet homogénat (ou la fraction N_1 isolée à partir de cet homogénat) devient capable de présenter une consommation d'oxygène traduisant la synthèse d'enzymes respiratoires. Notons que les travaux aujourd'hui contestés (158) de Bates et coll. (159, 160, 161) qui prétendaient avoir mis en évidence la synthèse de novo de cytochrome c dans des mitochondries isolées à partir de cellules de foie ou de muscle cardiaque nous avaient encouragés dans cette entreprise.

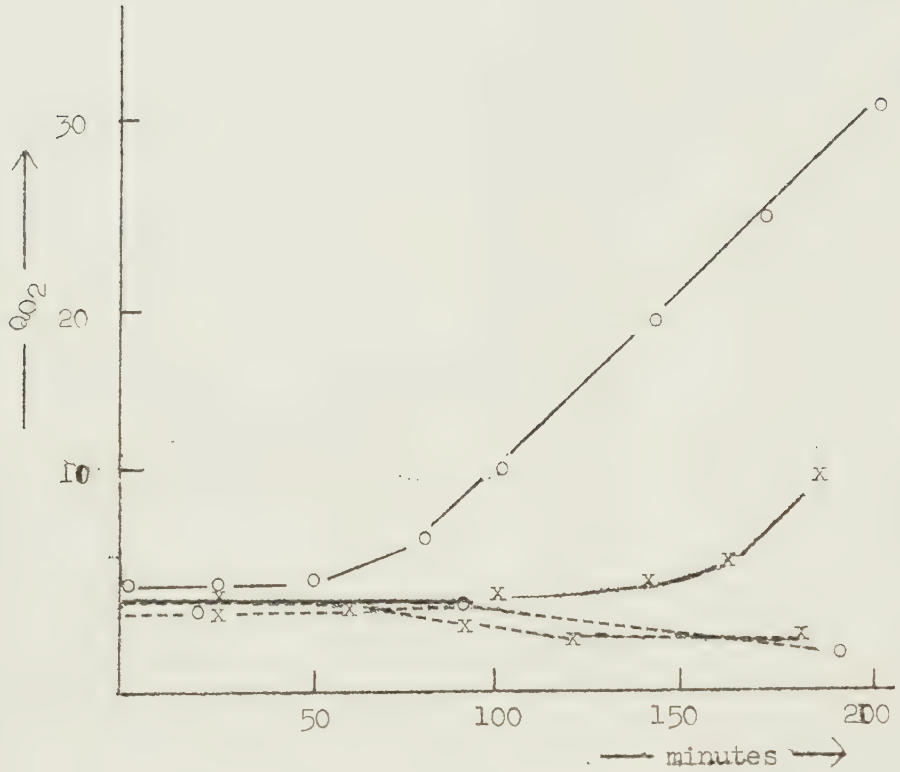


Figure 21: Adaptation respiratoire des cellules entières.
Milieu d'incubation: tampon phosphate M/15, pH 4,6
Addition au milieu: 0 x----x
KCN o-----o
Glucose o — o
Glucose + KCN x — x

XVIII: Vitesse de la respiration des cellules de levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie au temps zéro de l'adaptation respiratoire.
Milieu d'incubation: tampon phosphate M/15, pH 4,6.

Addition au milieu d'incubation	Q_{O_2} (µl/heure/mg poids sec) au temps zéro de l'adaptation
0	4,4
KCN	4,0
Glucose	6,7
Glucose + KCN	5,4

I - Adaptation respiratoire des cellules entières et des protoplastes.

A - Vitesse de respiration des cellules entières cultivées en anaérobiose placées en présence d'oxygène. Influence du cyanure.

Après leur récolte (effectuée quand la densité optique de la culture atteint 80 U.C.), les cellules de levure sont conservées à l'état non proliférant sous atmosphère d'azote, puis, elles sont mises en suspension dans un tampon phosphate M/15, pH 4,6, préalablement saturé d'air à 28°. L'instant où cette suspension est préparée (10 minutes avant la première lecture des manomètres) est considéré comme le temps zéro à partir duquel les levures sont mises en présence d'oxygène.

Les mesures manométriques de respiration ont été faites en présence et en absence de glucose à 1%, en faisant intervenir ou non du cyanure de potassium. Celui-ci a été utilisé à la concentration de 10^{-3}M; à cette concentration, la respiration des cellules de levures cultivées en aérobiose est inhibée de 93%.

Les courbes de la figure 21 représentent le Q_{O_2} en fonction de la durée d'incubation dans ces différentes conditions. En présence de glucose, la vitesse de respiration reste stationnaire pendant 50 minutes, puis s'accroît, pour atteindre un Q_{O_2} égal à 31.(µlitres O_2 consommés par heure/mg poids sec) au bout de 200 minutes d'incubation. En présence de cyanure et de glucose, elle reste constante pendant 140 minutes, puis elle augmente sans doute du fait de l'élimination du cyanure par distillation dans la potasse. En absence de glucose, la vitesse de respiration n'augmente pas au cours de l'incubation.

La vitesse de respiration au temps zéro de l'adaptation paraît peu influencée par addition de cyanure en présence ou en absence de glucose (Tableau XIV). Les différences entre les valeurs du Q_{O_2} en présence et en absence de cyanure sont peu significatives, elles sont du même ordre de grandeur que les erreurs de la méthode manométrique.

Ces résultats ont été confirmés par des dosages potentiométriques d'oxygène, faits en collaboration avec L. Ohanimce, à l'aide de la méthode de Tödt(162) permettant de mesurer les variations de la concentration d'oxygène dissous dans un

électrolyte: l'oxygène provoque entre deux électrodes des courants de diffusion dont l'intensité est fonction de la concentration de l'oxygène dissous.

B - Mesure de l'adaptation respiratoire des protoplastes.

Nous avons cherché à déterminer la vitesse de l'adaptation respiratoire de préparations contenant princip -ement des protoplastes obtenues de la façon suivante .:

- les levures sont récoltées soit à 35 U.C., densité optique pour laquelle nous avons étudié les transformations spectrales au cours de l'aération, soit à 80 U.C. Elles sont lavées deux fois par centrifugation à l'abri de l'air dans de l'eau distillée, glacée, saturée d'azote, d'un volume égal à celui de la culture. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans du lactose 0,25 M et additionné de SHP à raison de 0,1 ml par ml de suspension contenant 34 mg de poids sec de levures. Dans ces conditions, après 30 minutes d'incubation à 25°, la suspension est refroidie dans un bain de glace et centrifugée 5 minutes à 3.000 g. Les protoplastes sont ensuite remis en suspension soit dans le lactose 0,5 M, soit dans le PVP 7,5%.

Les mesures manométriques sont faites d'une part sur des suspensions de protoplastes, correspondant à 1-1,5 mg de protéine par essai, d'autre part sur des suspensions de cellules entières correspondant à 1,5-2 mg poids sec (soit 0,75 à 1 mg de protéine). Le milieu d'incubation contient dans les deux cas du tampon phosphate 0,037 M, pH 4,6 et du glucose 1 %. Les cellules entières après le lavage dans l'eau ont été conservées pendant la préparation des protoplastes dans le lactose 0,5 M ou dans le PVP 7,5 % à l'abri de l'air.

Les résultats sont donnés dans le Tableau XIX. et dans la figure 22.

La vitesse d'adaptation respiratoire (d^2O_2/dt^2) qui correspond à l'augmentation du Q_{O_2} en fonction du temps est représentée en unités de A_{O_2} ($\mu l\ O_2$/mg protéine/heure) (107). Dans le cas des protoplastes, cette vitesse reste constante depuis le début de l'expérience et pendant 4 heures. Dans le cas des cellules entières, cette

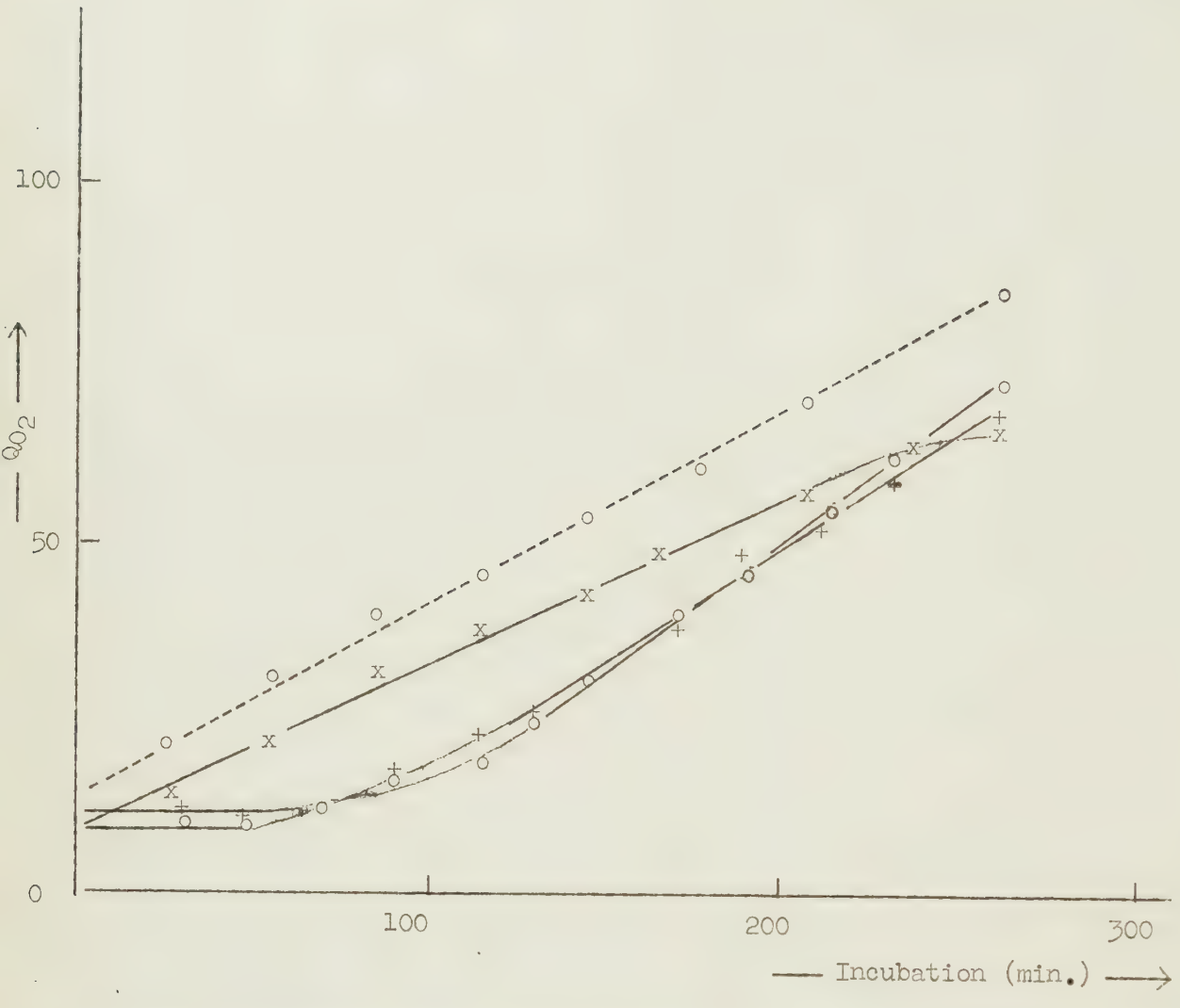


Figure 22: Adaptation respiratoire des cellules entières et des protoplastes.

Cellules entières mises en suspension dans le lactose + —— +
Cellules entières mises en suspension dans le PVP o —— o
Protoplastes mis en suspension dans le lactose x —— x
Protoplastes mis en suspension dans le PVP o --- o

Milieu d'incubation: tampon phosphate 1 ml à 0,074 M
glucose 0,2 ml à 10%
suspension de cellules entières ou de protoplastes dans le lactose ou dans le PVP: 0,8 ml

Densité optique de récolte de la culture: 80 U.C.

vitesse n'est constante qu'après 100 minutes environ d'incubation. Les valeurs de A_{O_2} maximum sont plus faibles pour les protoplastes que pour les cellules entières; cette différence peut s'expliquer par le fait que la suspension de protoplastes est contaminée par les débris cellulaires qui accroissent la quantité de protéines.

Tableau XIX: adaptation respiratoire des protoplastes et des cellules entières.

Milieu de suspension	d.o. récolte : 80 U.C.				d.o. récolte : 35 U.C.	
	Cellules entières		Protoplastes		Cellules entières	Protoplastes
	Lactose	PVP	Lactose	PVP	Lactose	Lactose
A_{O_2} *	21	22	13,5	16,5	18	12
Temps de latence de l'adaptation (min.)	50	50	0	0	70	0
Q_{O_2} ** au temps 0 de l'adaptation	11,8	10,6	9,0	12,5	10,0	8,0

* A_{O_2} : μ litres O_2/ mg protéines/heure^2

** Q_{O_2} : μ litres O_2/mg protéine/heure

II - Mesure de la respiration des mitochondries aérobies.

Différents auteurs ont réussi à obtenir des particules de levures capables de respirer en présence d'un certain nombre de substrats. Slonimski (35) a obtenu une fraction particulaire de levure présentant différentes activités déshydrogénases et une activité cytochrome-oxydase. Nossal et coll. (163) ont isolé des particules contenant plusieurs déshydrogénases et différents enzymes du cycle de Krebs. Linnane et Still (164) ont aussi isolé des particules de levures capables de respirer sur

différents substrats du cycle de Krebs ainsi que sur pyruvate et acétate, et qu'ils ont identifiées à des mitochondries. Raut-Hebb et coll. (124) ont trouvé que l'activité cytochrome-oxydase est associée à une fraction particulaire de type mitochondrial. Enfin, différents auteurs (165, 166, 126), ont démontré l'existence de phosphorylations oxydatives sur une fraction particulaire de levure.

Nous avons déterminé l'influence de quelques facteurs (composition et pH du milieu d'incubation, vitesse de désintégration des protoplastes) sur la respiration des mitochondries préparées d'après la technique de fractionnement décrite page 29. Nous avons ensuite comparé la respiration de ces mitochondries avec celle de particules isolées après broyage mécanique des cellules par le "Zell Homogenisator" (procédé analogue à celui employé par les différents auteurs mentionnés plus haut). Le milieu d'incubation que nous avons utilisé pour la respiration des mitochondries est à peu près identique à celui dont la composition est donnée par Linnane et Still (164).

A - Recherche de conditions optima de respiration de mitochondries isolées à partir des protoplastes.

Les mitochondries (fraction A_1) sont mises en suspension dans le lactose 0,8 M à raison de 10 mg environ de protéines par ml, mesurées d'après la méthode de Lowry et coll. Les mesures manométriques sont faites à 27°; le volume du liquide placé dans la capacité principale du récipient de Warburg est de 2 ml. Le substrat de respiration est le succinate de sodium. La première lecture est faite 5 minutes après l'introduction des récipients dans le bain-marie. Le dosage des protéines est effectué sur chaque essai à la fin de l'expérience.

1- Influence de l'addition de cofacteurs sur la vitesse de respiration:

Le Tableau XIV montre que la vitesse de respiration est stimulée par l'addition d'un certain nombre de cofacteurs. L'influence de chacun d'eux avait été précédemment étudiée en particulier par Linnane et Still (164). La vitesse de respiration est constante pendant 100 minutes environ.

Tableau XVI: Vitesse de respiration des mitochondries en présente et en absence de cofacteurs.
Milieu d'incubation pour 2 ml
tampon phosphate de potassium 0,033 M, pH 7,3
succinate de sodium 75 µmoles
cofacteurs: DPN et TPN 3.10^{-5}M
AMP 10^{-4}M
cystéine $2,5.10^{-3}$M
$MgCl_2$ $2,5.10^{-3}$M
TPP 100 µg

Protéines mg/essai	Q_{O_2} (µlitres O_2 consommés/heure/mg protéines)			
	- succinate - cofacteurs	- succinate + cofacteurs	+ succinate - cofacteurs	+ succinate + cofacteurs
2,5			13,5	17,0
			10,2	19,1
5	0	0,5	10,5	11,0
	0	0,7	11,0	14,5

2- Influence du pH du milieu de désintégration des protoplastes et du pH du milieu d'incubation des mitochondries sur la vitesse de respiration:

Le pH de la solution de PVP 7,5 % est égal à 4,4. L'addition des protoplastes porte ce pH à 6,5. Pour atteindre pH 7,3, il est nécessaire d'ajouter à 20 ml de cette suspension 1 ml de tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 7,3.

Le Tableau XVII montre que la vitesse de respiration ne dépend pas du pH du milieu de broyage des protoplastes entre 6,5 et 7,3, mais qu'elle dépend du pH du milieu d'incubation des mitochondries. Elle est environ 25 % plus rapide à pH 7,3 qu'à pH 6,5.

Tableau XVII: Influence du pH sur la vitesse de respiration des mitochondries.
Milieu d'incubation: tampon phosphate, succinate, cofacteurs, aux concentrations indiquées dans la légende du Tableau XVI.

pH		Q_{O_2}
Milieu de broyage des protoplastes	Milieu d'incubation des mitochondries	
6,5	6,5	15,0 15,7
6,5	7,3	18,9 20,9
7,3	7,3	20,5 20,7

3 - Influence de la vitesse de désintégration des protoplastes sur la vitesse de respiration:

L'examen au microscope optique montre que le rendement du broyage des protoplastes est à peu près identique pour une durée de désintégration de 20 minutes (le rhéostat du Virtis étant à 75) et pour une durée de désintégration de 6 minutes (le rhéostat étant à 100). Dans les deux cas, le broyage est interrompu à mi-temps par un arrêt de 10 minutes. Le Tableau XVIII montre que la vitesse de respiration des mitochondries isolées après un broyage rapide est la plus faible.

Tableau XVIII: Influence de la vitesse de désintégration des protoplastes sur la vitesse de respiration des mitochondries.

Milieu d'incubation: voir légende du Tableau XVII.

Désintégration (minutes)	Position du rhéostat du Virtis	Q_{O_2}
20	75	19,1 19,7
6	100	12,0 13,5

B - Comparaison entre la vitesse de respiration des mitochondries isolées à partir des protoplastes et celle des mitochondries isolées après broyage direct des cellules.

L'examen au microscope pptique des mitochondries obtenues par broyage direct (voir page 32) des cellules dans le lactose soit 0,5 M, soit 0,8 M montre que ces mitochondries sont devenues rondes et gonflées.*

Les valeurs indiquées dans le Tableau XIX montrent que, dans le cas du broyage direct des cellules, la fraction A_2 sédimentant entre 4.000 et 25.000 g possède

* Les mitochondries de foie de rat, isolées dans le saccharose 0,8 M, conservent leur forme allongée.

pratiquement la même activité respiratoire que la fraction sédimentant entre 1.000 et 4.000 g et doit par conséquent, contenir une grande quantité de débris mitochondriaux où sont localisés les systèmes respiratoires.

Tableau XIX: Vitesse de respiration des particules isolées après broyage direct des cellules ou après broyage des protoplastes. Milieu d'incubation: voir légende du Tableau XVII.

Fractions	Q_{O_2}		
	Particules isolées après broyage des cellules	Particules isolées à partir des protoplastes Expérience I	Expérience II
A_1	26,0 27,0	20,7 21,0	19,4 18,0
A_2	24,0 24,5	6,0 6,0	7,5 6,3

Dans le cas des particules isolées après broyage des protoplastes, l'activité respiratoire est localisée principalement dans la fraction A_1 riche en mitochondries intactes. L'activité respiratoire de la fraction A_2 varie d'une expérience à l'autre suivant la quantité de débris mitochondriaux qu'elle possède; il arrive d'ailleurs que cette fraction contienne les cytochromes c et $a + a_3$ en quantité spectroscopiquement décelable (cf. chapitre précédent).

Les résultats du Tableau XIX montrent que la respiration de la fraction A_1, préparée à partir des protoplastes, est environ 20% plus faible que celle de la fraction homologue isolée à partir des cellules directement broyées. Peut-être s'agit-il d'un phénomène analogue à celui observé dans le cas des mitochondries de muscle cardiaque et de cellules hépatiques qui oxydent les substrats plus lentement quand elles sont isolées dans le saccharose 0,8 M (milieu qui pourtant les conserve morphologiquement intactes) qu'après isolement dans le saccharose 0,25 M (milieu hypotonique qui provoque leur gonflement) (19). Il est aussi possible que les nombreux

et longues opérations nécessaires à la préparation de mitochondries de levures ayant conservé leur structure provoquent l'inactivation partielle de certains enzymes respiratoires.

III - Essais d'induction par l'oxygène de la synthèse des enzymes respiratoires dans des particules de levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie.

Les expériences ont été faites à partir d'homogénat ou de particules obtenus par fractionnement des protoplastes; en effet, il nous a paru préférable pour observer une éventuelle synthèse des cytochromes d'opérer sur des particules préparées dans les mêmes conditions que celles qui permettent d'obtenir des mitochondries aérobies ayant conservé leur intégrité morphologique et leurs caractéristiques spectroscopiques.

Les cellules de levures sont récoltées quand la densité optique est égale à 80 U.C.

L'homogénat, obtenu après broyage des protoplastes et séparation de la fraction sédimentant à 1.000 g, est divisé en trois: la première portion servira aux mesures manométriques, la deuxième portion servira à l'examen spectroscopique, et la troisième portion sera centrifugée à 4.000 g pendant 20 minutes pour séparer la fraction N_1.

A - Mesures manométriques effectuées sur les broyats ou sur la fraction particulaire N_1.

Les expériences ont été faites soit sur l'homogénat (suspension S), soit sur la fraction N_1 de telle sorte que la prise d'essai corresponde environ à 3 mg de protéine par récipient manométrique. Le milieu d'incubation est le même que celui utilisé pour la respiration des mitochondries aérobies, additionné ou non des substances suivantes (159):

- pour un récipient manométrique: ADP 2 µM, ATP 2 µM, glucose 1%, coenzyme A 0,3mg ou 0,6 mg, acides aminés 1 µM de chaque; le volume du liquide dans la capacité principale est toujours égal à 2 ml; ce volume est ajusté par addition d'une solution de PVP 7,5 % au milieu d'incubation.

Tableau XX: Vitesse de la consommation d'oxygène de l'homogénat de levure cultivée en anaérobiose placé dans différents milieux d'incubation.

Q_{O_2} = µlitres O_2 consommé/heure/mg protéine.

Addition au tampon phosphate	Milieu d'incubation								
Cofacteurs du milieu de respiration des mitochondries aérobies	0	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinate	0	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	0	0	+	+	+	+	0	+	+
ADP	0	0	0	0	+	+	0	+	+
ATP	0	0	0	+	0	+	+	0	0
Acides aminés	0	0	0	0	0	+	+	+	+
Coenzyme A	0	0	0	0	0	0	0	0	+

Experience	Protéines mg/essai	Q_{O_2}								
1	4,0	0	1,3	1,0	1,5					
2	4,6	0	0	0	0	2,1	2,7			
3	3,0 7,0			1,5	1,6	2,9 2,1	4,5 2,5			
4	2,8					3,5	5,4	4,5	5,5	
5	3,5				1,8	3,0	5,9	4,0	6,1	
6	2,6 4,3								4,5 5,6	4,8 5,5

Le Tableau XX donne les valeurs de la consommation d'oxygène rapportées à l'heure et au mg de protéine de l'homogénat placé dans différents milieux d'incubation. Dans tous les cas, la consommation d'oxygène (stimulée par l'addition d'un mélange d'acides aminés) est très faible. Aucun des essais effectués dans les mêmes conditions avec la fraction N_1 n'a permis d'obtenir un accroissement mesurable de la consommation d'oxygène.

B - Examen spectroscopique de l'homogénat après différentes durées d'aération.

L'homogénat ayant été additionné des constituants du milieu le plus complexe décrit au paragraphe précédent, l'aération est réalisée dans les mêmes conditions que l'aération des cellules entières décrites page 60.

Après des durées d'aération échelonnées entre 15 minutes et 5 heures, des échantillons de la suspension sont centrifugés 90 minutes à 105.000 g et les culots de centrifugation sont examinés par spectroscopie a la temperature de l'azote liquide. Dans aucun cas, on ne constate l'apparition du spectre cytochromique classique notamment des bandes d'absorption α des cytochromes c et a + a_3.

INTERPRETATION DES RESULTATS.

A- Adaptation à l'oxygène des protoplastes de levures.

Les facteurs qui interviennent dans l'adaptabilité respiratoire des cellules de levures semblent très divers. Nous avons déjà mentionné les travaux de Slonimski et coll. qui montrent d'une part que les cellules anaérobies provenant de la phase exponentielle de croissance sur milieu synthétique (NH_4^+ étant la seule source d'azote) sont très peu adaptables mais qu'elles le deviennent après une incubation en présence d'un mélange d'acides aminés (107) et d'autre part, que l'adaptation des cellules de phase exponentielle de croissance sur milieu à base d'extrait de levure est stimulée par certains facteurs oligosaccharidiques.(108, 109, 110).

Les résultats d'après lesquels les protoplastes de levures de phase exponentielle de croissance ainsi que les cellules intactes de phase stationnaire de croissance ne présentent pas de temps de latence dans l'adaptation, peuvent s'expliquer

soit par des variations de la perméabilité cellulaire au cours de la croissance, soit par le fait que l'élimination de la paroi cellulaire permette le départ d'un facteur réprimant la synthèse des enzymes respiratoires.

De plus, ces protoplastes qui présentent une vitesse d'adaptation constante pendant plusieurs heures et voisine de celle des cellules entières semblent devoir constituer un matériel intéressant pour l'étude de la formation induite par l'oxygène des enzymes respiratoires.

2- Vitesse de respiration des cellules entières et de l'homogénat de levures cultivées en anaérobiose.

La vitesse de respiration de l'homogénat de levures cultivées en anaérobiose n'augmente pas en fonction de la durée d'incubation en présence d'oxygène; il n'y a pas synthèse d'enzymes respiratoires. La faible consommation d'oxygène de cet homogénat doit être assimilée à la respiration insensible au cyanure des cellules entières récoltées au cours de leur croissance anaérobie.

Les courbes, données précédemment par Slonimski et coll. dans différentes publications, de l'adaptation respiratoire de levures prélevées en phase exponentielle (109) ou en phase stationnaire (107) de croissance, indiquent également une vitesse de respiration extrapolée au temps zéro non négligeable. Des résultats analogues ont aussi été obtenus d'une part par Lindenmayer (77), d'autre part par Harris avec une culture continue de levure en anaérobiose (45). Cette consommation d'oxygène ne semble pas dépendre de la fraction N_1 bien que, d'après les micrographies électroniques, cette fraction contienne des particules qui paraissent être de type mitochondrial.

L'adaptation à l'oxygène des cellules cultivées en anaérobiose ne détermine pas seulement une synthèse de protéines mais aussi un profond remaniement cellulaire correspondant à la formation de nouvelles particules. L'intégrité de la structure intracellulaire semble indispensable à la formation de ces particules, support des enzymes respiratoires.

C O N C L U S I O N

L'équipement enzymatique d'une même souche de levure pouvant varier suivant les conditions de vie des cellules, nous nous sommes attachés tout d'abord à suivre les transformations subies par le système cytochromique de la levure de boulangerie (souche Yeast Foam) soit au cours de sa croissance aérobie ou anaérobie, soit lors de l'aération de cellules non proliférantes dont la croissance s'est effectuée en anaérobiose, et ensuite à analyser la distribution intracellulaire des cytochromes des cellules cultivées soit en aérobiose, soit en anaérobiose.

Pour réaliser ce travail, il a été nécessaire

- d'avoir à notre disposition une méthode spectrographique utilisable à basse température, dans les milieux troubles;
- de déterminer d'une façon très rigoureuse les conditions de cultures (aérobie ou anaérobie) et de récolte des cellules de levure;
- de mettre au point une technique de fractionnement des cellules de levure endommageant le moins possible les structures subcellulaires.

Les résultats que nous avons obtenus concernant d'une part les cytochromes de la levure cultivée en aérobiose ou en anaérobiose sur milieu glucosé, d'autre part l'adaptation à l'oxygène des cellules cultivées en anaérobiose sont les suivants:

Cytochromes de la levure cultivée en aérobiose.

- Etude in situ:

Quel que soit le stade de la croissance de la culture, le spectre cytochromique (déjà décrit par Keilin) présente toujours les mêmes bandes d'absorption (à l'état réduit, à -190°: $c\alpha$ = 548 mμ, $c_1\alpha$ = 552-553 mμ, $b\alpha$ = 558 mμ, $(a + a_3)\alpha$ = 600 mμ). L'analyse des courbes spectrographiques révèle d'une part que la teneur en pigments cytochromiques est plus élevée en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance (ainsi que l'avaient déjà observé Slonimski et coll.), d'autre part que

les proportions relatives des différents pigments varient au cours de la croissance des cellules.

- Répartition intracellulaire des cytochromes des cellules de phase exponentielle de croissance aérobie:

Notre technique de fractionnement des levures nous a permis d'isoler trois fractions subcellulaires:

- une fraction riche en mitochondries denses et dans laquelle nous avons pu aussi mettre en évidence la présence de particules qu'il est possible d'assimiler aux "lysosomes" des cellules animales;
- deux fractions issues principalement du réticulum endoplasmique dont l'une est riche en granulations de type ribosomique associées à des éléments membraneux et dont l'autre est constituée surtout de ribosomes libres.

Les cytochromes de la levure, comme ceux des cellules de mammifères, sont associés aux structures cytoplasmiques insolubles; les mitochondries et le reticulum endoplasmique.

Cytochromes mitochondriaux.

Le spectre réduit de la fraction mitochondriale présente les mêmes bandes d'absorption que celui de la cellule entière. La réduction des cytochromes a été obtenue par des substrats intervenant dans la chaîne respiratoire (DL-lactate, succinate, DPNH); l'ascorbate réduit les cytochromes c, c_1 et a + a_3 et non le cytochrome b.
Le cytochrome c est entièrement localisé dans les mitochondries. Cependant, il peut s'en détacher facilement, et dans ce cas, sédimente en partie avec la fraction ribosomique.
Le cytochrome b_2 (L-lacticodéshydrogénase) est également localisé dans les mitochondries
En présence de DL-lactate, nos résultats montrent que l'apparition de bandes d'absorption à 552 mμ et à 558 mμ dépend non seulement des bandes $c_1\alpha$ et $b\alpha$, mais aussi des deux bandes α du cytochrome b_2.

Cytochromes du réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique contient un composé hématinique dont le spectre, qui n'a pu être réduit que par l'hydrosulfite, DPNH et TPNH, présente deux bandes d'absorption

intenses à 551,5 mμ et à 557,5 mμ. Ce pigment semble associé aux éléments membraneux endoplasmiques. Le spectre de ce pigment, sa localisation intracellulaire, la nature des substrats capables de le réduire sont identiques à ceux du cytochrome b_5 de la cellule hépatique.

Cytochromes de la levure cultivée en anaérobiose.

- Etude in situ:

Nous avons établi que le spectre à -190° de la levure cultivée en anaérobiose, présente en phase exponentielle de croissance, quel que soit le taux de croissance, deux bandes α principales situées à 552,5 mμ et à 558 mμ et une faible bande située à 574,5 mμ. Les deux premières bandes correspondent à un pigment dit "cytochrome b_1"; ce cytochrome n'est pas autoxydable in situ (à pH 4,6); son groupement prosthétique est le protohème.

Le spectre d'absorption des cellules se modifie progressivement pendant la phase de ralentissement de la croissance et présente en phase stationnaire des bandes d'absorption situées aux longueurs d'onde suivantes: 540 mμ, 555 mμ, 574,5 mμ, 583,5 mμ, 630 mμ; la bande située à 583,5 mμ correspond à un pigment possédant un hème de type A.

- Aspect morphologique des fractions subcellulaires. Localisation intracellulaire du cytochrome b_1:

Le fractionnement de la levure cultivée en anaérobiose nous a permis d'isoler d'une part une fraction contenant des particules d'aspect variable pourvues d'une double membrane qu'il est possible d'assimiler au point de vue morphologique à des "mitochondries" et d'autre part, deux fractions d'aspect identique aux fractions homologues de la levure aérobie issues principalement du réticulum endoplasmique.

Le spectre du cytochrome b_1 se retrouve dans les trois fractions particulaires isolées. Toutefois, d'après l'intensité des bandes d'absorption du spectre de ces fractions, il semble que dans la cellule le cytochrome b_1 soit localisé non dans les particules de type mitochondrial mais dans des éléments membraneux du réticulum endoplasmique.

Dans les fractions le cytochrome b_1 peut être réduit par l'hydrosulfite par DPNH, par TPNH et par l'ascorbate. Il ne peut être assimilé au cytochrome b_2 car il n'est pas réduit par le lactate (l'activité lacticodéshydrogénase anaérobie est d'ailleurs, dans nos conditions de fractionnement, surtout localisée dans la fraction soluble). Il ne peut être assimilé non plus au cytochrome 551,5 mμ, 557,5 mμ mis en évidence dans une fraction non mitochondriale de la levure aérobie, puisqu'il est réduit par l'ascorbate.

Ni par le fractionnement cellulaire, ni par l'action de différents agents réducteurs, il n'est possible de séparer les deux bandes α d'absorption du cytochrome b_1; il est donc probable que ces bandes correspondent à un seul cytochrome de type b.

Il se dégage principalement de cette étude:

- d'une part, que l'absorption observée dans le spectre de la cellule entière à 552-553 mμ et à 558 mμ dépend non seulement des cytochromes c_1 et b, mais aussi du cytochrome b_2 et d'un cytochrome analogue au cytochrome b_5;
- d'autre part, que le cytochrome b_1 (α = 552,5 mμ et α = 558 mμ), composé hématinique de la levure de phase exponentielle de croissance anaérobie ne peut être assimilé à aucun des cytochromes de la levure cultivée en aérobiose, absorbant aux mêmes longueurs d'onde.

Adaptation à l'oxygène des levures cultivées en anaérobiose.

1- Les résultats de l'étude spectrographique des transformations qui se produisent lors de l'aération . des levures cultivées en anaérobiose ne nous permettent pas d'envisager que tel pigment anaérobie puisse être précurseur de tel pigment aérobie.

2- Slonimski a établi que l'adaptation respiratoire des levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie, présente un temps de latence alors que celle des levures récoltées en phase stationnaire n'en présente pas. Nous avons observé que ce temps de latence n'existe pas non plus lors de l'adaptation respiratoire des protoplastes de cellules de levure récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie. Ces faits peuvent s'expliquer soit par des variations de la

perméabilité cellulaire au cours de la croissance, soit par l'élimination des protoplastes d'un facteur réprimant la synthèse des enzymes respiratoires.

3- Il ne nous a pas été possible d'obtenir l'induction par l'oxygène de la synthèse des enzymes respiratoires dans un homogénat de levure provenant de culture anaérobie La faible consommation d'oxygène de cet homogénat dépend sans doute de la respiration insensible au cyanure que les cellules entières, récoltées en anaérobiose, présentent au temps zéro de leur adaptation à l'oxygène. L'adaptation respiratoire semble donc nécessiter l'intégrité des structures intracellulaires. Comme le montre l'examen morphologique des particules de levures cultivées en aérobiose ou en anaérobiose, l'adaptation respiratoire doit provoquer la synthèse de mitochondries vraies, les particules de type mitochondrial observées en anaérobiose n'étant que des formations peu différenciées.

B I B L I O G R A P H I E

1- A.J.BROWN, J. Chem. Soc., 87 (1905) 1395.

2- H.T. BROWN, Ann. Bot., 28 (1914) 197.

3- F. WINDISCH, Biochem. Z., 246 (1932) 332.

4- J. WHITE et D.J. MUNNS, Wallerstein Lab. Commun, 14 (1951) 199.

5- C. CANTARELLI, Ann. Inst. Pasteur, 90 (1956) 645.

6- R.E. SCALP et T.J.B. STIER, Trans. Ky. Acad. Sci., 13 (1950) 69.

7- A.A. ANDREASEN et T.J.B. STIER, J. cell. and Comp. Physiol.,
I - 41 (1953) 23
II - 43 (1954) 271
III - 48 (1956) 317.

8- D. KEILIN, Proc. Roy. Soc. London,B98 (1925) 312.

9- D. KEILIN et E.F. Hartree, Nature, 141 (1938) 870.

10- D. KEILIN et E.F. Hartree, Proc. Roy. Soc. London, B 127 (1939) 167.

11- O. WARBURG, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. W. Saenger, ed. Berlin, 1946.

12- D. KEILIN et E.F. HARTREE, Nature, 164 (1949) 254.

13- E. YAKUSHIGI et K. OKUNUKI, Proc. Imp. Acad. Tokyo, 17 (1941) 263.

14- B. HAGIHARA, T. HORIO, J. YAMASHITA, M. NOZAKI et K. OKUNUKI, Nature,178(1956)629.

15- B. CHANCE, Advances in Enzymology, 17 (1956) 65.

16- B. CHANCE et M. BALTSCHEFFSKY, Biochem. J., 68 (1958) 283.

17- W.D. BONNER Jr., Haematin Enzymes, J.E. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton ed., Pergamon Press, 1961, p. 479.

18- T.M. DEVLIN et A.L. LEHNINGER, J. Biol. Chem., 233 (1958) 1586.

19- D.E. GREEN, Advances in Enzymology, 21 (1959) 73.

20- H.D. AGAR et H.C. DOUGLAS, J. Bact., 73 (1957) 371.

21- Y. YOTSUYANAGI, Comptes Rendus, 248 (1959) 274.

22- E. VITOLS, R.J. NORTH et A.W. LINNANE, J. Biophys. Biochem. Cytol.,9 (1961) 689.

23- T.R. THYAGARAJAN, S.F. CONTI et H.B. NAYLOR, Exp. Cell. Research, 25 (1961) 216.

24- B. CHANCE, Methods in Enzymology, vol. IV, p. 273, S.P. Colowick et N.O. Kaplan ed. Academic Press, N.Y., 1957.
25- S.J. BACH, M. DIXON et L.G. ZERFAS, Biochem. J., 40 (1946) 239.
26- C.A. APPLEBY et R.K. MORTON, Biochem. J. 71 (1959) 492.
27- M. RIPPA, Arch. Biochem. Biophys., 94 (1961) 333.
28- E. BOERI, E. CUTOLO, M. LUZZATI et L. TOSI, Arch. Biochem. Biophys., 56 (1955) 487.
29- A.P. NYGAARD, Biochim. Biophys. Acta, 30 (1958) 450.
30- A. LINDENMAYER et R.W. ESTABROOK, Arch. Biochem. Biophys., 78 (1958) 66.
31- G.L. BROWN, Acta Chem. Scand., 7 (1953) 435.
32- R. ABRAMS, A.M. ALTSCHUL et T.R. HOGNESS, J. Biol. Chem., 142 (1942) 303.
33- B. EPHRUSSI et P.P. SLONIMSKI, Biochim. Biophys. Acta, 6 (1950) 256.
34- A. LINDENMAYER et L. SMITH, Fed. Proc., 16 (1957) 212.
35- P.P. SLONIMSKI, Thèse Sciences, Paris, 1952.
36- C.F. STRITTMATTER et E.G. BALL, Proc. Nat. Ac. Sci., U.S.A., 38 (1952) 10.
37- J. POSTGATE, Biochim. Biophys. Acta, 18 (1955) 427.
38- S.R. ELSDEN, M.D. KAMEN et L.P. VERNON, J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 6.347.
39- L.P. VERNON et M.D. KAMEN, J. Biol. Chem., 211 (1954) 643.
40- H.E. DAVENPORT et R. HILL, Proc. Roy. Soc. London, B139 (1952) 327.
41- C.H. CHIN, IIème Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, résumé des Communications p. 277.
42- P. CHAIX et J.F. PETIT, Biochim. Biophys. Acta, 25 (1957) 481.
43- J. MONOD, Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Hermann et C° ed. Paris, 1942.
44- B. EPHRUSSI, P.P. SLONIMSKI, Y. YOTSUYANAGI et J. TAVLITZKI, Comptes Rendus, Lab. Carlsberg Ser. Physiol., 26 (1956) 87.
45- M. HARRIS, J. Cell and Comp. Physiol., 48 (1956) 95.
46- H.P. KLEIN, J. Bact., 69 (1955) 620.
47- H.P. KLEIN, J. Bact., 73 (1957) 530.
48- T.T. TCHEN et K. BLOCH, Abstr. Am. Chem. Soc., 130th Meeting 56 C et 57 C (1956).
49- L.S. WICKERHAM, Tech. Bull., n° 1029 (1951) USDA.
50- A. SORGENSEN, A. HANSEN et A. LUND, Microorganisms and fermentations, p. 190, Charles Griffin and C°, 1939, London.
51- T.E. FRIEDMANN et R. KLAAS, J. Biol. Chem., 115 (1936) 47.

52- D. KEILIN et E.F. HARTREE, J. Microbiol. Serol., 12 (1947) 115.
53- P. CHAIX et C. FROMAGEOT, Bull. Soc. Chim; biol., 24 (1942) 1259.
54- P. CHAIX et J.F. PETIT, Biochim. Biophys. Acta, 22 (1956) 66.
55- P. CHAIX et T. HEYMAN-BLANCHET, Biochim. Biophys. Acta, 26 (1957) 214.
56- B. CHANCE, J. Biol. Chem., 217 (1955) 395.
57- R. LEMBERG et J.W. LEGGE, Hematin Compounds and Bile Pigments, Interscience Pub., 1949.
58- F.L. MYERS et D.H. NORTHCOTE, J. Exp. Biol., 35 (1958) 639.
59- P.A. ROELOFSEN, Biochim. Biophys. Acta, 10 (1953) 477.
60- D.H. NORTHCOTE et R.W. HORNE, Biochem. J., 51 (1952) 232.
61- J. GIAJA, C.R. Soc. Biol., Paris, 86 (1922) 708.
62- A.A. EDDY et D.H. WILLIAMSON, Nature, 179 (1957) 1252.
63- G. SMITS, Biochim. Biophys. Acta, 1 (1947) 280.
64- F. ZAJDELA et G.A. MORIN, Revue d'Hématologie, 7 (1952) 628.
65- M.W. WOODS, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 87 (1954) 71.
66- A.B. NOVIKOFF, Symposia Soc. Exp. Biol., 10 (1957) 92.
67- R.E. GREENFIELD, V.E. PRICE, Abstracts Am. Chem. Soc. N.Y., 1954, p. 48 C.
68- A.B. NOVIKOFF, IIIème International Congress Biochem., 1956, p. 315, New York, Academic Press.
69- P.M. NOSSAL, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 31 (1953) 583.
70- M. MERKENSCHLAGER, K. SCHLOSSMANN et W. KURZ, Biochem. Z., 329 (1957) 332.
71- W.W. UMBRETT, R.H. BURRIS et S.F. STAUFER, Manometric technics and tissue metabolism, Burgess Pub. C°, Minneapolis.
72- P.P. SLONIMSKI, Respiration and the growth of yeast (Society of Chemical Industry Monograph, n°3).
73- O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265.
74- A.G. GORNALL, C. BARDAWILL et M.M. DAVID, J. Biol. Chem., 177 (1949) 751.
75- F. LABEYRIE, P.P. SLONIMSKI et L. NASLIN, Biochem. Biophys. Acta, 34 (1959) 262.
76- P. CHAIX et G. RONCOLI, Biochim. Biophys. Acta, 6 (1950) 268.
77- A. LINDENMAYER, J. Cellular Comp. Physiol., 53 (1959) 93.
78- R.W. ESTABROOK, Biochim. Biophys. Acta, 19 (1956) 184.
79- I. SEKUZU, Y. ORIO et K. OKUNUKI, J. Biochem., 48 (1960) 214.

80- R. BOMSTEIN, R. GOLDBERGER et H. TISDALE, Biochim. Biophys. Acta, 50 (1961) 527.
81- R. LEMBERG, Advances in Enzymology, 23 (1961) 265.
82- M. YCAS et D.L. DRABKIN, J. Biol. Chem., 224 (1957) 921.
83- T. HEYMAN-BLANCHET et P. CHAIX, Biochim. Biophys. Acta, 35 (1959) 85.
84- H. CHANTRENNE, Biochim. Biophys. Acta, 14 (1954) 157.
85- L. SMITH, Communication personnelle.
86- A.C.MAEBLY et B. CHANCE, Methods of Biochemical Analysis, Interscience,Press, ed. D.Glick, New York, 1954, vol. I, p. 357.
87- D. KEILIN, Nature, 172 (1953) 390.
88- B.L. HORECKER, J. Biol. Chem., 148 (1943) 173.
89- D.L. DRABKIN, J. Biol. Chem., 164 (1946) 703.
90- G. TERUI , N. KONNO et M. SASE,Tech. Rep. Osaka Univ., 10 (1960) 527.
91- E. NEGELEIN et W. GERISCHER, Biochem. Z., 268 (1934) 1.
92- D. KEILIN et C.H. HARPLEY, Biochem. J., 35 (1941) 688.
93- J. BARRETT, Biochim. Biophys. Acta, 54 (1961) 580.
94- A. FUGITA et T. KODAMA, Biochem. Z., 232 (1931) 20.
95- H. CHANTRENNE et C. COURTOIS, Biochim. Biophys. Acta, 14 (1954) 397.
96- F. MOSS, Aust. J. Exp. Biol. Med.,Sci., 34 (1956) 395.
97- L. SMITH, Bact. Rev., 18 (1954) 106.
98- H. FINK et E. BERWALD, Biochem. Z., 258 (1933) 141.
99- C.H. CHIN, Nature, 165 (1950) 926.
100- J. KEILIN, Biochem. J., 64 (1956) 663.
101- H. TAMIYA, Acta Phytochim., 4 (1928) 215.
102- P. SCHAEFFER, Biochim. Biophys. Acta, 9 (1952) 261.
103- P. CHAIX et P. FLAMENS, Biochim. Biophys. Acta, 11 (1953) 530.
104- J.P. HENNESSY, Biochem. J., 80 (1961) 22 P.
105- S.E. KENCH, Nature, 173 (1954) 214.
106- D. KEILIN et A. TISSIERES, Nature, 172 (1953) 393.
107- P.P. SLONIMSKI, IIIème International Congress Biochem., 1956, p. 242, New York, Academic Press.
108- P.P. SLONIMSKI et H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, Ciba Found. Symp. on Drug Resistance, 1957, p. 210.
109- P.P. SLONIMSKI, J. DEFAYE, J. ASSELINEAU et E. LEDERER, Comptes Rendus, 249 (1959) 192.

110- L. AUDRAIN-LEGAULT-DEMARE, P.P. SLONIMSKI, J. DEFAYE et E. LEDERER, Comptes Rendus, 251 (1960) 1828.
111- C. GREGOLIN, A. GHIRETTI-MAGALDI, Biochim. Biophys. Acta, 54 (1961) 62.
112- R. KATTERMAN et P.P. SLONIMSKI, Comptes Rendus, 250 (1960) 220.
113- H.O. HALVORSON, Advances in Enzymology, 22 (1960) 99.
114- A. GUILLIERMOND, Le Chondriome; Hermann Ed., 1934.
115- C.C. LINDEGREN, The Yeast Cell, its genetics and cytology, 1949, Educational Publishers, St Louis, Missouri.
116- D.B. MUNDKUR, Nature, 171 (1953) 793.
117- P.E. HARTMAN et C. LIU, J. Bact., 67 (1954) 77.
118- E. BAUTZ, Naturwiss., 42 (1955) 49;
42 (1955) 619.
119- Y. YOTSUYANAGI, Nature, 176 (1955) 1208.
120- S. MUDD, Bact. Revs., 20 (1956) 268.
121- M.A. WILLIAMS, C.C. LINDEGREN, A. YUASA, B. EPHRUSSI, P.P. SLONIMSKI et Y. YOTSUYANAGI, Nature, 177 (1956) 1041.
122- G.E. PALADE, J. Histochem. Cytochem., 1 (1953) 188.
123- F.S. SJOSTRAND, Nature, 171 (1953) 30.
124- C. RAUT-HEBB, J.D. MONTGOMERY et J. SLEBODNIK, Exp. Cell. Research., 14 (1958)495.
125- E. VANDERWINKEL, R.H. DE DEKEN et J. M. WIAME, Exp. Cell Research, 15 (1958) 418.
126- E. VITOLS et A.W. LINNANE, J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 (1961) 701.
127- G.E. PALADE, J. Biophys. Biochem. Cytol., 1 (1955) 59.
128- F.C. CHAO, K.H. SCHACHMAN, Arch. Biochem. Biophys., 61 (1956) 220.
129- H.P. KLEIN et Z.K. BOOHER, Biochim. Biophys. Acta, 20 (1956) 387.
130- C. RAUT-HEBB, J. SLEBODNIK, T.P. SINGER et P. BERNATH, Arch. Biochem. Biophys. 83 (1959) 10.
131- G.E. PALADE, J. Exp. Med., 95 (1952) 285.
132- M.L. WATSON, J. Biophys. Biochem. Cytol., 4 (1958) 475.
133- F. ZAJDELA, T. HEYMAN-BLANCHET et P. CHAIX, Comptes Rendus, 253 (1961) 1268.
134- A. GUILLIERMOND, G. MANGENOT et L. PLANTEFOL, Traité de Cytologie végétale, 1933, Le Français ed., Paris.
135- A.B. NOVIKOFF, M. BEAUFAY et C. DE DUVE, J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, n°4 suppl. (1956) 179.

136--L. GENEVES, A. LANCE et R. BUVAT, Comptes Rendus, 247 (1958) 2080.

137- B. CHANCE, Haematin Enzymes, J.E. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton Ed., Pergamon Press, 1961, p. 597.

138- H.C. HEMKER et W.C. HULSMANN, Biochim. Biophys. Acta, 44 (1960) 175.

139- P.P. SLONIMSKI et W. TYSAROWSKI, Comptes Rendus, 246 (1958) 1111.

140- A.P. NYGAARD, J. Biol. Chem., 236 (1961) 920.

141- M. SOMLO, Communication personnelle.

142- M. SOMLO, Biochim. Biophys. Acta, sous presse.

143- P. GALZY et P.P. SLONIMSKI, Comptes Rendus, 245 (1957) 2556.

144- T. HORIO, J. YAMASHITA, T. YAMANAKA, M. NOZAKI et K. OKUNUKI, Haematin Enzymes, J.E. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton Ed., Pergamon Press, 1961, p. 552.

145- R. MONIER, F. ZAJDELA, P. CHAIX et J.F. PETIT, Cancer Research, 19 (1959) 927.

146- C. WIDMER et F.L. CRANE, Biochim. Biophys. Acta, 27 (1958) 203.

147- K.S. AMBE et F.L. CRANE, Science, 129 (1959) 98.

148- B. CHANCE, J. Biol. Chem., 233 (1958) 1223.

149- E.C. SLATER, Haematin Enzymes, J.E. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton Ed., Pergamon Press, 1961, p. 594.

150- E.C. SLATER, Biochem. J., 45 (1949) 1.

151- C.A. APPLEBY et R.K. MORTON, Biochem. J., 73 (1959) 539.

152- R.K. MORTON, Rvs. Pure Appl. Chem., 8 (1958) 161.

153- R.K. MORTON et J.D. ARMSTRONG, Vth International Congress of Biochem., Moscou, 1961, Symposium n°5, preprint.

154- D. GARFINKEL, Ist Symposium Biophysical Society, Pergamon Press, 1958.

155- P. CHAIX, J.F. PETIT, R. MONIER et F. ZAJDELA, Bull. Soc. Chim. biol., 40 (1958) 1897.

156- R.K. MORTON, Haematin Enzymes, J.E. Falk, R. Lemberg et R.K. Morton Ed., Pergamon Press, 1961, p. 498.

157- M. IWATSUBO et F. LABEYRIE, Communication personnelle.

158- M.V. SIMPSON, D.M. SKINNER et J.M. LUCAS, J. Biol. Chem., 236 (1961) PC 81.

159- H.M. BATES, V.M. CRADDOCK et M.V. SIMPSON, J. Am. Chem. Soc., 80 (1958) 1.000.

160- H.M. BATES, G.H. KALF et M.V. SIMPSON, Fed. Proc., 18 (1959) 187.

161- H.M. BATES et M.V. SIMPSON, Biochim. Biophys. Acta, 32 (1959) 597.

162- F. TODT, Elektrochemische Sauerstoffmessungen, Walter de Gruyter et C° ed., Berlin, 1958.

163- P.M. NOSSAL, D.B. KEECH et D.J. MORTON, Biochim. Biophys. Acta, 22 (1956) 412.

164- A.W. LINNANE et J.L. STILL, Arch. Biochem. Biophys., 59 (1955) 383.

165- M.F. UTTER, D.B. KEECH et P.M. NOSSAL, Biochem. J., 68 (1958) 431.

166- J.M. HODGES et W. MARX, Arch. Biochem. Biophys., 83 (1959) 563.

T A B L E D E S M A T I E R E S

Pages

INTRODUCTION 1

Liste des abréviations utilisées dans le texte 6

PREMIERE PARTIE - MISE AU POINT DES TECHNIQUES UTILISEES 7

CHAPITRE I - TECHNIQUES DE CULTURE -
ESTIMATION DE LA CROISSANCE DES LEVURES 8

I - SOUCHES 8

II - ESTIMATION DE LA CROISSANCE DES CULTURES 8

A - Rapport entre poids sec et densité optique 9
B - Rapport entre densité optique et nombre de cellules 9
C - Etablissement de la courbe de croissance 10

III - CULTURE EN AEROBIOSE..... 10

A - Conditions de culture 10
B - Milieu de culture 10
C - Courbe de croissance 11

IV - CULTURE EN ANAEROBIOSE..... 11

A - Conditions de culture 12
B - Milieux de culture 13
C - Conditions de récolte des levures cultivées en anaérobiose 18

CHAPITRE II - TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROGRAPHIQUES ... 21

I - PREPARATIONS SERVANT AUX ETUDES SPECTRALES 22

II- EXAMEN SPECTROSCOPIQUE 22

III- TECHNIQUE SPECTROGRAPHIQUE 23

A - Spectrographie 23
B - Enregistrement 23
C - Renseignements fournis par cette méthode 24

IV- PREPARATION DES HEMOCHROMES DE PYRIDINE 25

Pages

CHAPITRE III - TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT DES CELLULES DE LEVURE 26

I - FRACTIONNEMENT APRES DIGESTION ENZYMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE 26

A - Préparation des protoplastes 26

B - Broyage des protoplastes 30

C - Séparation des particules 33

II- BROYAGE MECANIQUE DIRECT DES CELLULES DE LEVURE 33

CHAPITRE IV - AUTRES TECHNIQUES UTILISEES 35

I - TECHNIQUES MANOMETRIQUES 35

II- DOSAGE DES PROTEINES 35

A - Methode de dosage 35

B - Détermination de la teneur en protéines des cellules de levure 37

III- DOSAGE DE L'ACTIVITE LACTICODESHYDROGENASE 38

DEUXIEME PARTIE - ETUDE IN SITU DE L'EQUIPEMENT CYTOCHROMIQUE DES CELLULES DE LEVURE CULTIVEE EN AEROBIOSE ET EN ANAEROBIOSE 39

CHAPITRE I - VARIATIONS DU SPECTRE CYTOCHROMIQUE DE LA LEVURE EN FONCTION DE SES PHASES DE CROISSANCE 40

I - CAS DE LA LEVURE CULTIVEE EN AEROBIOSE 40

A - Description des spectres cytochromiques 41

B - Spectre de l'hémochrome de pyridine des pigments de la levure cultivée en aérobiose 42

C - Discussion 42

II- CAS DE LA LEVURE CULTIVEE EN ANAEROBIOSE 45

A - Description de l'évolution du spectre des levures 45

B - Influence de différents facteurs sur l'évolution du spectre 48

C - Spectre des hémochromes de pyridine des pigments de levures cultivées en anaérobiose 51

D - Discussion 52

CONCLUSION 58

Pages

CHAPITRE II - ETUDE DES TRANSFORMATIONS DU SPECTRE CYTOCHROMIQUE PAR AERATION DE LA LEVURE RECOLTEE AU COURS DE SA CROISSANCE ANAEROBIE 60

I - Transformation du spectre de la souche normale 62

A - Cultures sur milieu à base d'extrait de levure 62

B - Cultures sur milieu synthétique 64

II- Etude spectrographique de la souche mutante "petite colonie" 64

A - Spectre des cellules cultivées en aérobiose 64

B - Transformation par aération du spectre des cellules récoltées au cours de leur croissance anaérobie..... 65

Discussion..... 67

Conclusions 70

TROISIEME PARTIE : ETUDE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE LA LEVURE RECOLTEE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE 72

CHAPITRE I - EXAMEN MICROSCOPIQUE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES PREPAREES A PARTIR DE LEVURES RECOLTEES EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE .. 74

I - Préparation des fractions subcellulaires - Concentrations relatives en protéines de ces fractions 75

II- Examen morphologique des différentes fractions 77

A - Fractions sédimentant entre 1.000 et 4.000 g 77

B - Fractions sédimentant entre 4.000 et 25.000 g 78

C - Fractions sédimentant entre 25.000 et 105.000 g 78

Discussion et conclusion 79

CHAPITRE II - ETUDE DE LA DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE DES CYTOCHROMES DE LA LEVURE RECOLTEE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE AEROBIE OU ANAEROBIE 80

I - Etude spectrographique des différentes fractions 81

A - Cas de la levure cultivée en aérobiose 81

B - Cas de la levure cultivée en anaérobiose 84

Pages

II - Etude de la localisation subcellulaire de l'activité lacticodéshydrogénase 85

A - Activité lacticodéshydrogénase des fractions isolées à partir de la levure cultivée en aérobiose 86

B - Activité lacticodéshydrogénase des fractions isolées à partir deslà levure cultivée en anaérobiose 88

DISCUSSION 89

CONCLUSION 96

CHAPITRE III - ETUDE DE L'APTITUDE RESPIRATOIRE DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES 97

I - Adaptation respiratoire des cellules entières et des protoplastes 99

A - Vitesse de respiration des cellules entières cultivées en anaérobiose, placées en présence d'oxygène. Influence du cyanure 99

B - Mesure de l'adaptation respiratoire des protoplastes 100

II- Mesure de la respiration des mitochondries aérobies 101

A - Recherche de conditions optima de respiration de mitochondries isolées à partir des protoplastes 102

B - Comparaison entre la vitesse de respiration des mitochondries isolées à partir des protoplastes et celle des mitochondries isolées après broyage direct des cellules 104

III- Essais d'induction par l'oxygène de la synthèse des enzymes respiratoires dans des particules de levures récoltées en phase exponentielle de croissance anaérobie 106

A - Mesures manométriques effectuées sur les broyats ou sur la fraction particulaire N_1 106

B - Examen spectroscopique de l'homogénat après différentes durées d'aération 108

INTERPRETATION DES RESULTATS 108

CONCLUSION 110

BIBLIOGRAPHIE 115

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"Rôle des quinones dans la respiration cellulaire".

Vu et approuvé :

Paris, le 11 Mars 1962.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

M. ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE